

УДК 578.8:616.988-036.1:616.155.1:616.511

НОВИЙ ПАРВОВІРУС ЛЮДИНИ ТА КЛІНІЧНІ ПРОЯВИ ЗАХВОРЮВАННЯ, ЩО ВІН ВИКЛИКАЄ

І. В. Дзюблик, доктор медичних наук, професор

О. В. Обертинська, кандидат медичних наук, доцент

Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, (Київ, Україна)

Резюме. Прогрес в галузі молекулярно-генетичних технологій призвів до відкриття нового парвовірусу, що отримав назву бокавірусу людини. Перший бокавірус людини HBoV1 був виявлений та ідентифікований методом полімеразної ланцюгової реакції у хворих на пневмонію у 2005 році. Ще три бокавіруси HBoV2-4 вперше були ідентифіковані в 2009-2010 роках. У статті представлено новітню інформацію щодо структури HBoV1-4, місця в класифікації та особливостей репродукції. Представлені шляхи передачі та особливості епідеміології бокавірусної інфекції. Наведені основні клінічні прояви бокавірусної інфекції у дітей та дорослих, методи лабораторної діагностики.

Ключові слова: новий парвовірус, бокавіруси людини, бокавірусна інфекція, лабораторна діагностика, епідеміологія.

Резюме. Прогрес в области молекулярно-генетических методов исследования способствовал открытию нового парвовируса, получившего название бокавируса человека. Первый бокавирус HBoV1 был выявлен и идентифицирован методом полимеразной цепной реакции в 2005 году. Еще три бокавируса HBoV2-4 впервые были идентифицированы в 2009-2010 годах. В статье представлена новейшая информация о структуре, месте в классификации и репродукции бокавирусов. Изложены пути передачи возбудителя и особенности эпидемиологии бокавирусной инфекции. Приведены основные клинические проявления бокавирусной инфекции у детей и взрослых, методы лабораторной диагностики.

Ключевые слова: новый парвовирус, бокавирусы человека, бокавирусная инфекция, лабораторная диагностика, эпидемиология.

Summary. Progress in molecular genetic research techniques contributed to the discovery of a new parvovirus, called human bocavirus. First discovered bocavirus HBoV1 was detected and identified by polymerase chain reaction in 2005. Another three bocaviruses HBoV2-4 were identified at first in 2009-2010. The paper presents the newest information about structure, place in the classification and reproduction of bocaviruses. There are described the ways of transmission and features of epidemiology of bocavirus infection. The main clinical manifestations of bocavirus infection in children and adults, as well as laboratory diagnostics, are presented.

Keywords: new parvovirus, human bocavirus, bocavirus infection, laboratory diagnosis, epidemiology.

Актуальність. До родини парвовірусів належать дуже маленькі ДНК-вмісні віруси простої будови, що досить поширені у біосфері. Їх розміри такі малі, що це знайшло відображення у їх назві (від лат. *parvum* - маленький). Для всіх парвовірусів дуже характерним є вузький спектр патогенності. Вони уражають ссавців, птахів та комах. Парвовірус, патогенний для людини, вперше був описаний в 1974 році під назвою «сироватковий парвовірусоподібний агент В19», а у 1995 році він отримав назву «вірус В19». Парвовірус В19 найчастіше викликає у людини інфекційне захворювання, відоме під назвою «інфекційна еритема» або «п'ята хвороба».

За останні 10 років прогрес в галузі молекулярно-генетичних технологій та геномної ампліфікації нуклеїнових кислот (НК) призвів до відкриття нових збудників вірусної природи, серед яких найбільшу увагу привертають до себе метапневмовірус людини (HMPV-human metapneumovirus), коронавіруси людини NL63, HKU1 та Урбані (SARS-коронавірус), поліомавіруси Кі і WU, та новий парвовірус, що отримав назву бокавірусу людини (*Human Bocavirus* або скорочено HBoV).

Історична довідка. Вперше бокавірус (HBoV) людини був виявлений та ідентифікований методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) Томасом Алландером та колегами у хворих на пневмонію у 2005 році в Швеції. Ампліфіковані продукти ПЛР були відокремлені по вектору та сіквеновані. Після оцінювання подібностей в структурі HBoV було встановлено, що виділений вірус є новим представником родини парвовірусів (рис. 1).

У 2006 році НВoV був виявлений у дітей Канади з клінічними проявами гострої респіраторної вірусної інфекції (ГРВІ). Від того часу новий вірус стали пов'язувати із захворюваннями верхніх та нижніх дихальних шляхів дорослих та дітей.

У січні 2009 року надійшло повідомлення з Індії про виявлення у зразках фекалій дітей педіатричних відділень бокавірусу нового типу, названого НВoV-2 (Кароор А., Slikas E., Simmonds P., et al., 2009). Проведений філогенетичний аналіз нового збудника показав, що НВoV-2 подібний до НВoV-1. Подібність для білків NS1, NP1, VP1/VP2 за складом амінокислот між двома вірусами становила відповідно 78%, 67% та 80%. Проте, між вірусами була виявлена і певна розбіжність у будові геномів, що, вірогідно, і пояснює феномен відкриття НВoV-2 лише через 4 роки поспіль від НВoV-1.

В квітні 2009 року в Австралії був відкритий третій бокавірус людини - НВoV-3 (Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, et al., 2009). Австралійські вчені, як і їх попередники, завдячують своїм відкриттям методу ПЛР, проте цього разу вони досліджували дітей, хворих на гостру кишкову інфекцію (ГКІ). Філогенетичний аналіз геному НВoV-3 виявив його близьку гомологію до НВoV-1 в області кодування неструктурних білків NS1, NP1.

НВoV-4 вперше був ідентифікований в 2010 році (Кароор А., Simmonds P., Slikas E. et al., 2010).

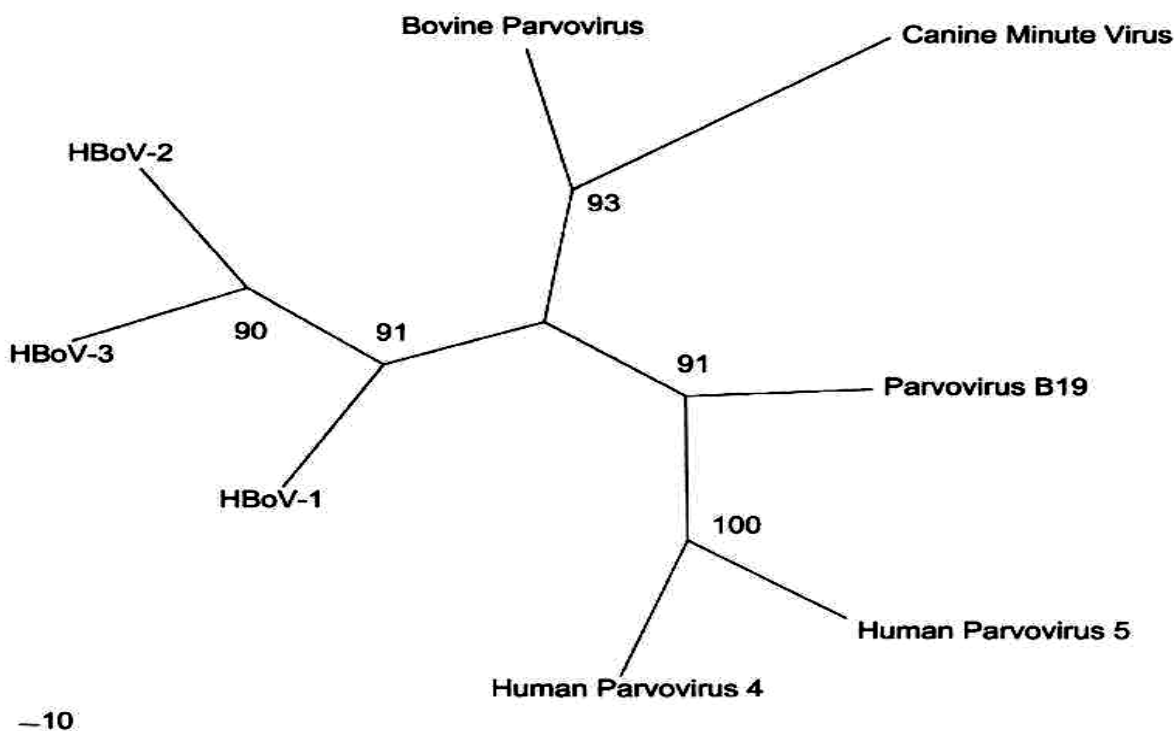


Рис. 1. Філогенетичний аналіз парвовірусу тварин та парвовірусу людини.

Філогенетичне дерево побудовано з використанням програми PHYLIP DNAML і показує штами парвовірусів тварин та парвовірусів людини (НВoV-1 [Номер у Генетичному Банку .NC_007455.1], НВoV-2 [NC_012042.1]; НВoV-3 [NC_012564.1]; парвовірус ВРХ [DQ335247.1], парвовірус собак СпMV [NC_004442.1], Парвовірус В19 [AY386330.1]; Парвовірус людини 4 [EU874248.1], та Парвовірус людини 5 [DQ873391.1]).

Загальна характеристика бокавірусів людини. Бокавіруси людини віднесені до родини Parvoviridae. До родини увійшли дві підродини: Parvovirinae та Densovirinae. До підродини Parvovirinae увійшли 5 родів: Parvovirus, Dependovirus, Erythrovirus, Amdovirus та Bocavirus. До підродини Densovirinae увійшли 4 роди парвовірусів, здатних уражати комах та не патогенні для людини. Таким чином, бокавіруси людини НВoV-1, НВoV-2, НВoV-3 та НВoV-4 віднесені до родини Parvoviridae, підродини Parvovirinae, роду Bocavirus та

найбільш подібні до парвовірусу великої рогатої худоби (ВРХ) та парвовірусу собак (СnMV). Бокавіруси людини посіли друге місце серед парвовірусів, патогенних для людини. Перше місце залишилося за парвовірусом В19, збудником інфекційної еритеми.

НВoV є простими ДНК-вмісними вірусами, що мають розміри 18-26 нм (Рис.2). Суперкапсидної оболонки не мають. Білкова оболонка (капсид) кубічного типу симетрії, надає вірусній частці (віріону) сферичної форми.

Капсид НВoV складається з 60 симетрично розташованих субодиниць - капсомерів. Кожний капсомер побудований із 2-х капсидних білків, які позначаються як *virus protein 1* (VP1) і *virus protein 2* (VP2). Білки капсиду складають 60-80% всієї маси віріону. Молекулярна маса VP1 (найбільшого капсидного білка) коливається в межах 83-96 кДа, для VP2 вона становить 58-85 кДа. Капсидні білки VP1 і VP2 є структурними білками, оскільки приймають участь у будові віріону. Ліпідів та вуглеводів у складі НВoV немає.

В серцевині віріону знаходиться геном НВoV, який представлено лінійною одонитковою нефрагментованою молекулою ДНК. Геном має від 4 до 6 тисяч пар нуклеотидів (п.н.), три відкриті рамки зчитування, що кодують два структурні білки VP1 і VP2 та два неструктурних білки NS1 і NP1 вірусу. Роль неструктурних білків і досі залишається невідомою. Встановлено, що геном НВoV не кодує полімерази, а від так, його реплікація залежить виключно від ДНК-полімерази клітини-хазяїна. ДНК-вий геном бокавірусів виявляє інфекційну активність.

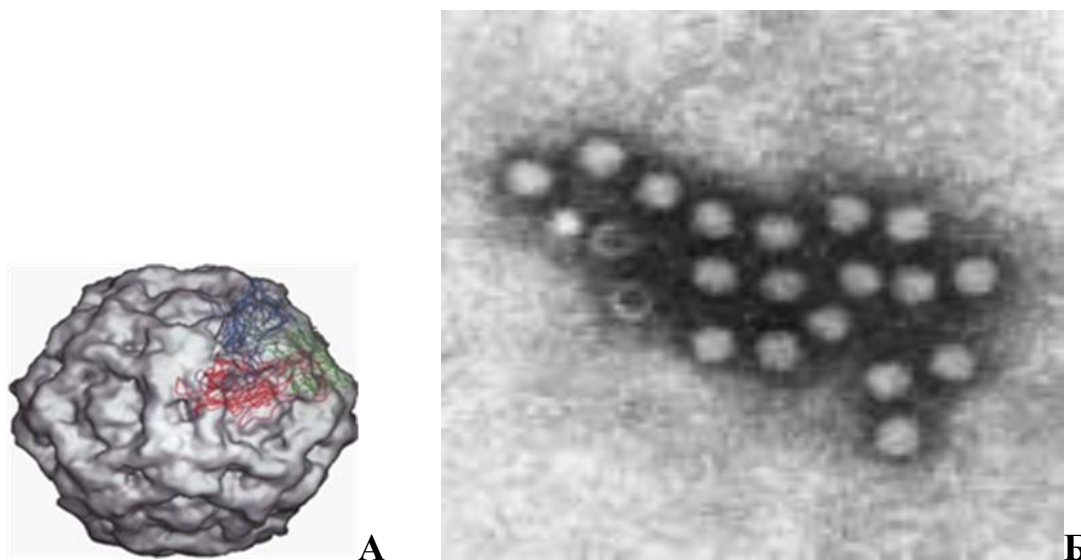


Рис. 2. Схема будови (А) та електронограма НВoV-1(Б)

Проста будова бокавірусів забезпечує їм надзвичайно високу стійкість у навколишньому середовищі до дії різних фізико-хімічних чинників та органічних розчинників. За межами організму людини в навколишньому середовищі НВoV здатні тривало, протягом багатьох місяців, зберігати свою інфекційну активність. Віруси стійкі до прогрівання при температурі 56°C впродовж 1 год, до перебування у кислому середовищі (РН 3,0). Бокавіруси людини стійкі до дії формаліну у концентрації 0,1%, органічних розчинників (хлороформу, спиртів, жовчі, трипсину), впливу фізичних методів інактивації.

Майже миттєво НВoV руйнуються при кип'ятінні, чутливі до обмеженої кількості дезінфектантів (гіпохлорид, глутаральдегід, формальдегід, β -пропіонлактон та деяких інших). У 0,5% розчині формаліну, НВoV гинуть впродовж 24 год.

Всі парвовіруси мають унікальний геном, представлений одонитчастою лінійною нефрагментованою молекулою ДНК. На обох кінцях геномної ДНК наявні інвертовані послідовності. У багатьох представників родини парвовірусів геномна ДНК має негативну

полярність і позначається як ДНК-мінус. У частини представників родини геном має позитивну полярність (ДНК-плюс). Позитивна та негативна нитки ДНК у парвовірусів комплементарні одна одній і в умовах *in vitro* можуть утворювати повнорозмірну двониткову ДНК. У бокавірусів геномна ДНК з позитивною або негативною полярністю включається до складу віріону з різною частотою. Відповідно і співвідношення віріонів з ДНК-плюс та ДНК-мінус геномом буває різним. Життєвий цикл НВов в чутливій клітині включає наступні основні етапи:

- взаємодію вірусу з рецепторами клітини-хазяїна та проникнення вірусу в чутливу клітину за механізмом рецепторного ендоцитозу;
- «Роздягання» вірусу у ядрі клітини, перетворення однострону молекули геномної ДНК у двониткову ДНК під дією ДНК-полімерази клітини-хазяїна;
- транскрипцію неструктурних білків NS1 і NP1 та ініціацію циклів реплікації однострону молекули ДНК;
- транскрипцію структурних білків VP1 і VP2 під контролем не-структурних протеїнів;
- збирання вірусних часток під контролем NS1 в ядрі клітини-хазяїна, міграцію зрілих вірусних часток у цитоплазму та вихід в міжклітинний простір в результаті лізису інфікованої клітини.

Схема та основні етапи репродукції НВов в чутливій клітині представлено на рис.3.

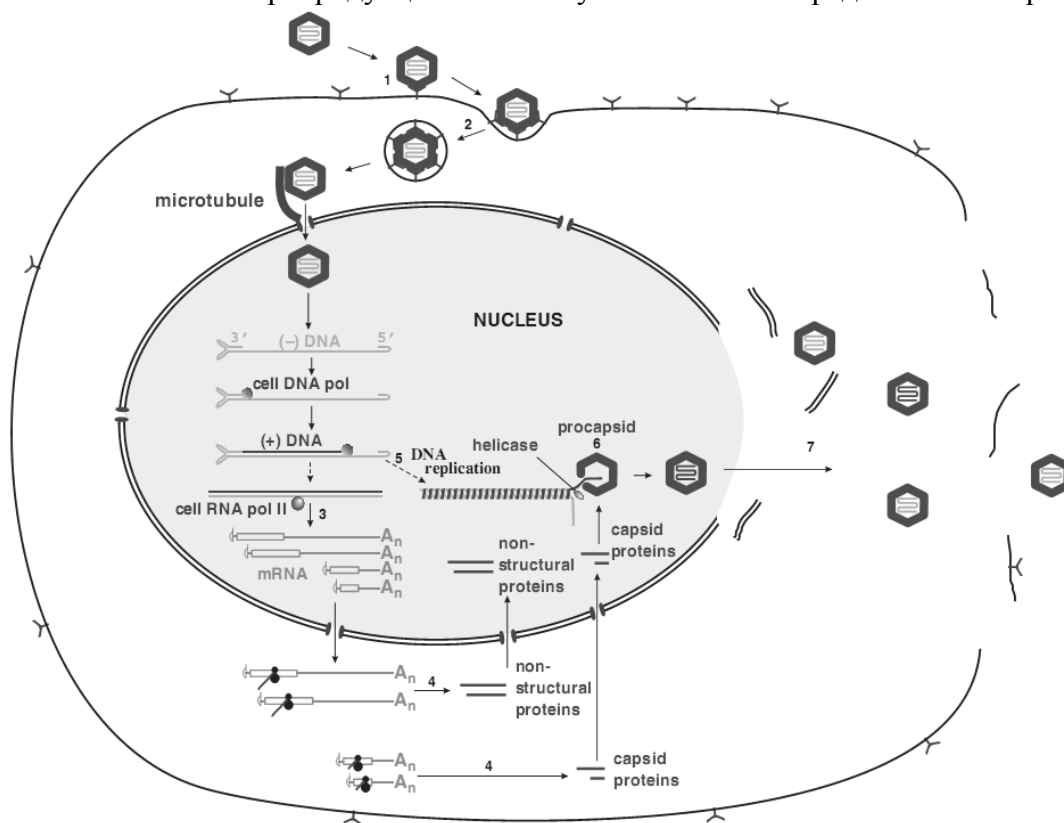


Рис. 3. Схема та основні етапи репродукції бокавірусу людини

1. Взаємодія вірусу з рецепторами клітини
2. Проникнення вірусу в клітину
3. Транскрипція
4. Трансляція
5. Реплікація геномної ДНК
6. Збирання
7. Вихід вірусу з клітини

Шляхи передачі та особливості епідеміології. Через те що НВов були ідентифіковані та визнані як нові збудники не так давно, шляхи передачі та особливості епідемічного процесу при бокавірусній інфекції ще остаточно не визначені. Найкраще досліджено НВов-

1. Більшість дослідників схиляються до думки, що основним шляхом передачі НВов-1 є повітряно-крапельний, а в якості резервного може виступати фекально-оральний. НВов-1 був визнаний у всьому світі у зв'язку з захворюваннями верхніх і нижніх дихальних шляхів. Можна стверджувати, що на сьогодні НВов-1 має поширення в 28 країнах світу на п'яти континентах.

Встановлено, що в етіологічній структурі ГРВІ населення Європи НВов-1 займає одне з перших місць. Так, за даними німецьких дослідників, захворювання, що викликані НВов-1 посідають друге місце після РС-інфекції. У Франції та в Іспанії в етіологічній структурі гострих респіраторних захворювань за останні 2-3 роки НВов-1 поступається лише РС-вірусу та риновірусам. У Фінляндії НВов-1 посідає четверте місце після риновірусів, ентеровірусів та РС-вірусу.

Бокавіруси виявлено у дітей та дорослих, у дітей віком від 10 діб життя та у дорослих осіб старших 71 року. Проте переважна більшість НВов-1-позитивних зразків взяті у дітей віком до 5 років. Оцінюючи вікові особливості поширення бокавірусної інфекції серед дітей важливо відмітити велику кількість серопозитивних дітей у віці до 2 місяців, що пов'язано з можливістю вертикальної передачі материнських антитіл. Встановлено, що подальше зниження частки інфікованих дітей спостерігається протягом перших 4 - 6 місяців життя, що, ймовірно, свідчить про зменшення титрів материнських антитіл класу IgG в організмі дитини. Низький відсоток анти-НВов антитіл у дітей від 6 до 12 місяців корелює з популяційними дослідженнями, які показують, що діти у цьому віці, мають більш високий ризик виникнення бокавірусної інфекції. У 5-річному віці більшість дітей вже зустрічались із вірусом, перехворіли і мають антитіла проти НВов-1 та проти інших респіраторних вірусів, таких як РС-вірус, риновіруси, віруси грипу. Проте, через труднощі культивування НВов-1 в умовах *in vitro* та за відсутності експериментальної моделі на лабораторних тваринах, ще належить визначити, які саме антитіла забезпечують захист дитини від бокавірусної інфекції. Також важливо уточнити, чи антитіла проти НВов-1 будуть захищати від НВов-2, НВов-3 або НВов-4, і навпаки. Вважається, що більшість захисних (віруснейтралізуючих) антитіл синтезуються в у відповідь на бокавірусну інфекцію проти структурних білків VP1 і VP2, при цьому висока гомологія білків вірусного капсиду може створити перехресно реагуючі антитіла для всіх бокавірусів. Проте, дослідження сероепідеміології інфекцій, викликаних збудниками НВов-2, НВов-3 і НВов-4 ще знаходяться на самому початку свого шляху.

Для бокавірусної інфекції (НВов-1) характерна сезонність. Сезонний підйом захворюваності на бокавірусну інфекцію, зумовлену НВов-1 у Північній півкулі відбувається на початку зими. Про це свідчить більшість досліджень, в тому числі і дослідження, проведені серед дітей Москви, госпіталізованих у період з 2005 по 2007 роки (рис. 4).

Проведені перспективні дослідження встановили, що у дітей до 5 років, госпіталізованих із захворюваннями бронхолегеневої системи, НВов-1 викликав спорадичну захворюваність протягом року, при цьому пік захворюваності припадав на грудень місяць. Проте є поодинокі роботи, які вказують на збільшення частоти НВов-1 інфекцій протягом весни, і навіть з травня по липень місяць або зовсім спростовують існування очевидної сезонності.

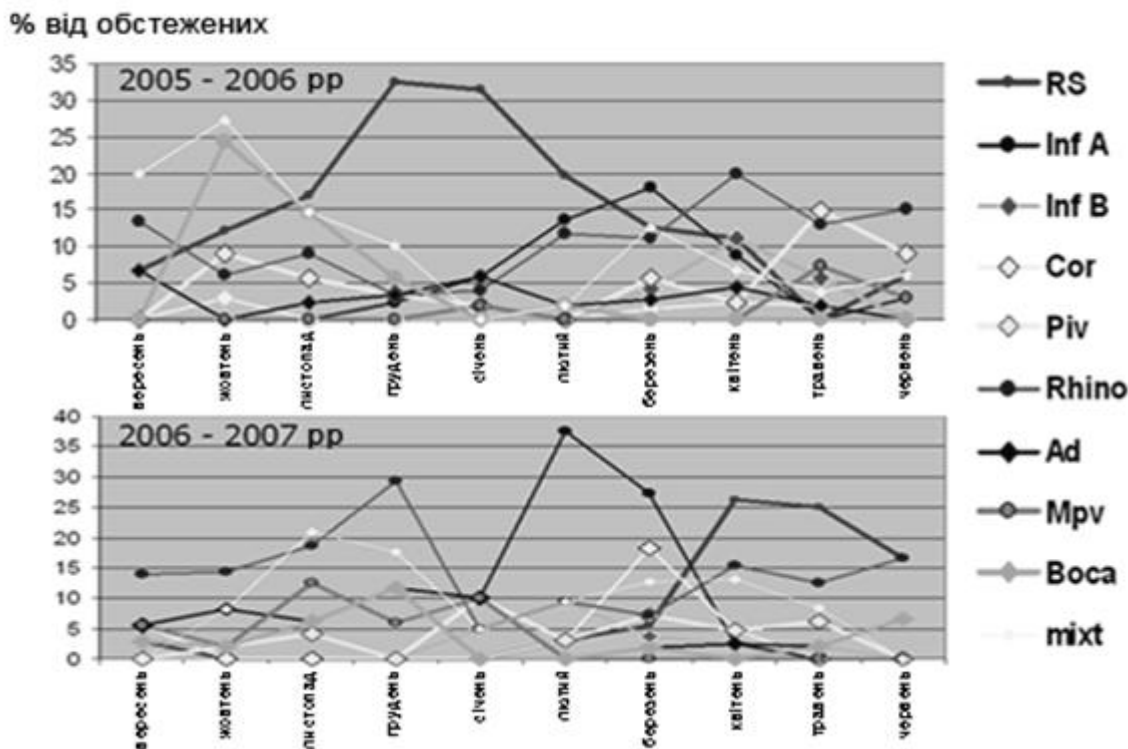


Рис. 4. Етіологічна структура ГРВІ серед дітей м. Москва (помісячно).

Бокавіруси і респіраторні захворювання. Після відкриття НВов-1 Алландером в 2005 році, було опубліковано більше 60 досліджень, щодо ролі цього вірусу у виникненні та розвитку захворювань бронхолегеневої системи у дітей та дорослих. Більшість пацієнтів, що приймали участь у цих дослідженнях мали симптоми захворювань верхніх дихальних шляхів, у тому числі кашель (78,9%), гарячку (67,1%) і нежить (66,2%). Фарингіт і висипання зустрічалися рідко - в 11% -13% випадків. Крім того, пацієнти як правило, скаржилися на біль у вухах.

В багатьох дослідженнях повідомлялось, що НВов-1 було виявлено у дітей, госпіталізованих із діагнозами ГРВІ, бронхіоліт, загострення бронхіальної астми, ринофарингіт, ларинготрахеїт, гострий бронхіт та утруднене дихання. Утруднене дихання було помічене у більш ніж 50% дітей, у яких НВов-1 був визнаний в якості єдиного збудника захворювання. Встановлена етіологічна роль НВов-1 у розвитку негоспітальної пневмонії у пацієнтів у Таїланді та Йорданії. Питома вага НВов-1 в етіологічній структурі вірусних негоспітальних пневмоній в Російській Федерації за період 2005-2007 роки коливалась від 4,0% до 28% (рис.5).

Бокавірусну інфекцію було виявлено у пацієнтів з імунodefіцитом при респіраторних і шлунково-кишкових захворюваннях, у пацієнтів після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин, у дітей з гострим лімфобластним лейкозом, у дорослих осіб з ВІЛ-інфекцією.

У нещодавній доповіді Алландера було вказано на те, що геному ДНК НВов-1 було виявлено не тільки в носоглоткових змивах або мазках, але й у сироватці крові важко хворих дітей на респіраторну інфекцію, проте питання про наявність та тривалість віремії, або реальну можливість контролювати вірусне навантаження в крові залишається відкритим. Можна зазначити також, що на часі ще не встановлено тривалість інкубаційного періоду при респіраторній бокавірусній інфекції.

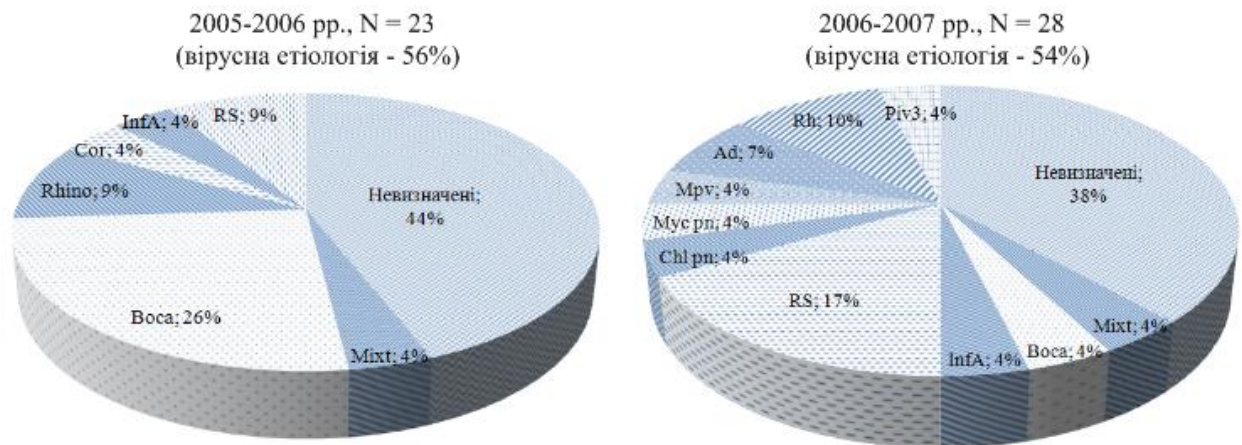


Рис. 5. Вірусна етіологія не госпітальних пневмоній в РФ

Найчастіше до основних клінічних проявів респіраторної бокавірусної інфекції відносяться: підвищення температури тіла (від 37,5° до 40,2°С), фарингіт, ринорея тривалістю від 2 до 23 діб, утруднене дихання та кашель. Важливо підкреслити, що на сьогоднішній день, не описано жодного смертельного випадку, пов'язаного з НВоV-1.

Є повідомлення про те, що досить часто НВоV-1 виявляється одночасно з ентеровірусами, риновірусами, РС-вірусом, вірусами парагрипу, грипу, респіраторними аденовірусами та корона вірусами людини, метапневмовірусом.

Бокавіруси і симптоми ураження ШКТ. В багатьох дослідженнях показано, що у майже 25% пацієнтів, які мають НВоV-1 респіраторні інфекції, реєструються симптоми ураження ШКТ (Табл. 1). Це діарея (14%), зневоднення, нудота, блювота (23,9%) та інші прояви, що свідчать про те, що НВоV-1 уражає не тільки дихальні шляхи людини. Важливо підкреслити, що кількість НВоV-1, що виявляється у фекаліях хворих є значно меншою, ніж в зразках, відібраних з дихальних шляхів пацієнтів.

Подібно до досліджень при респіраторних захворюваннях, бокавіруси знаходять при ГКІ у дітей і дорослих разом з відомими кишковими патогенами вірусної та бактеріальної природи з рівнем ко-інфекції в межах 21% - 77,6%. До виявлених ко-патогенів належать норовіруси 1 та 2 типу, ротавіруси групи А, каліцівіруси людини, астровіруси, аденовіруси 40 та 41 типу, *Campylobacter*, *Salmonella*, і *Clostridium difficile*. Значно частіше у пацієнтів з гострим гастроентеритом зустрічається НВоV-2. Клінічне значення НВоV-3 та НВоV-4 при ГКІ залишається нез'ясованим.

Діагностика бокавірусної інфекції складна. На сьогоднішній день НВоV-1 не вдається культивувати в стандартних перещеплюваних клітинних культурах в умовах *in vitro* або в організмі лабораторних тварин *in vivo*. Ця невдача є однією з основних перешкод на шляху нашого розуміння цього вірусу.

Після відкриття НВоV-1 для лабораторної діагностики бокавірусної інфекції у дітей і дорослих розроблені та широко використовуються молекулярно-генетичні методи дослідження - ПЛР з електрофоретичною детекцією, ПЛР в режимі реального часу та *nest-ПЛР* (*nested PCR*, «вкладена» ПЛР або гніздова ПЛР). Останній метод використовується в ПЛР-діагностиці для підвищення специфічності реакції, а також для зменшення числа побічних продуктів реакції та підвищення її чутливості. Це досягається завдяки використанню двох пар праймерів, специфічних щодо ДНК-мішені та проведення двох послідовних реакцій ПЛР.

Є повідомлення про використання ампліфікації, заснованої на сіквенсі нуклеїнової кислоти для виявлення НВоV-1 в зразках фекалій (*Nucleic Acids Sequence Based Amplification - NASBA*). *NASBA* у реальному часі – це техніка ізотермічної ампліфікації нуклеїнової кислоти, яка проводиться при плюс 41° С, що дозволяє відмовитися від устаткування, яке забезпечує

циклічну зміну високих температур. В лабораторній діагностиці бокавірусної інфекції NASBA використовується в якості альтернативи ПЛР для виявлення вірусів.

Серологічна діагностика здійснюється дуже рідко. Вона проводиться у парних сироватках крові методом імуноферментного аналізу (ІФА) і дозволяє виявити специфічні антитіла класів IgM, IgG та наростання титрів антитіл в 4 та більше разів. Значним обмеженням серологічної діагностики є її ретроспективний характер, оскільки перша сироватка крові відбирається у гострому періоді, а друга – через 3-4 тижні у періоді реконвалесценції.

Етіотропна терапія бокавірусної інфекції не розроблена.

Рекомендована базисна або підтримуюча терапія. Додаткова киснева і механічна вентиляція легень можуть бути використані для підтримки пацієнтів, які мають НВов-1-пов'язані респіраторні захворювання. На часі описано лише одне дослідження, в якому до 28% НВов-1-інфікованих дітей потребувало інтенсивної терапії, хоча і не всі потребували дихальної допомоги, а один з пацієнтів, який мав ко-інфекцію РС-вірусу і НВов-1, потребував підтримки шляхом екстракорпоральної мембранної оксигенації. Специфічна профілактика бокавірусної інфекції не розроблена.

Висновки. Через те що НВов були ідентифіковані та визнані як нові для людини збудники не так давно, епідеміологічні та клінічні прояви захворювань, пов'язаних з цими вірусами стають зрозумілими тільки зараз. На часі нові повідомлення про виявлення НВов в матеріалах від хворих різних вікових груп на ГРВІ або ГКІ надходять із Франції, Австралії, Японії, Італії, Ізраїлю, Іспанії, Германії, Індії, Бразилії та Росії. При цьому, показники захворюваності людей на бокавірусну інфекцію в цих країнах коливаються досить в широких межах, а їх клінічні прояви характеризуються значним розмаїттям. І хоча кількість доказів патогенності нового парвовірусу людини невпинно зростає, все ж таки залишається ще надто багато не з'ясованого, в тому числі залишається відкритим питання щодо можливої циркуляції збудника на території України та його ролі у розвитку захворювань органів дихання та шлунково-кишкового тракту серед дорослого та дитячого населення країни.

Література

1. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(36): 12891-6.
2. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. J Infect Dis 2009; 199(2): 196-200.
3. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, et al. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. PLoS Pathog 2009;5(4):e1000391.
4. Bastien N, Brandt K, Dust K, et al. Human bocavirus infection, Canada. Emerg Infect Dis 2006; 12(5):848-50.
5. Allander T, Jarti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. Clin Infect Dis 2007;44(7):904-10.
6. Brieu N, Gay B, Segondy M, et al. Electron microscopy observation of human bocavirus (HBoV) in nasopharyngeal samples from HBoV-infected children. J Clin Microbiol 2007;45(10):3419-20.
7. Lindner J, Modrow S. Human bocavirus—a novel parvovirus to infect humans. Intervirology 2008;51(2):116-22.
8. Chow BD, Huang YT, Esper FP. Evidence of human bocavirus circulating in children and adults, Cleveland, Ohio. J Clin Virol 2008;43(3):302-6.
9. Schenk T, Strahm B, Kontny U, et al. Disseminated bocavirus infection after stem cell transplant. Emerg Infect Dis 2007; 13(9): 1425-7.
10. Monteny M, Niesters HG, Moll HA, et al. Human bocavirus in febrile children, The Netherlands. Emerg Infect Dis 2007; 13(1): 180-2.
11. Jacques J, Moret H, Renois F, et al. Human bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis. J Clin Virol 2008;43(2): 142-7.