

УДК579.833.29:599.323.4(571.63):574.3

Л.Н. Яшина¹, Л.И. Иванов², Р.А. Слонова³, Г.Г. Компанец³, В.В. Гуторов¹, Т.В. Кушнарева³, Н.П. Высочина², С.А. Абрамов⁴, Т.А. Дунал⁴, Н.М. Пуховская², Н.И. Здановская²

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (пос. Кольцово Новосибирской обл.), ²Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора, ³НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток), ⁴Институт систематики и экологии животных СО РАН (г. Новосибирск)

ХАНТАВИРУСЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ В ПОЛЕВКАХ *MICROTUS FORTIS* И *MICROTUS MAXIMOWICZII*

Ключевые слова: хантавирус, полевки, генотип.

Методом обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием — были изучены 8 полевых штаммов хантавирусов, выделенных от полевок рода *Microtus* из дальневосточного региона России. Было проведено независимое зоологическое определение вида грызунов-носителей и анализ их митохондриальной ДНК. Сравнительный анализ установленных нуклеотидных последовательностей фрагментов М-сегмента вирусного генома штаммов хантавирусов и мтДНК полевок-носителей с нуклеотидными последовательностями, представленными в базе данных GenBank, выявил циркуляцию двух генотипов KBRV и VLAV в двух видах полевок — носителей вирусов. Наши исследования впервые выявили циркуляцию генотипов KBRV в полевках *M. maximowiczii* и VLAV в полевках *M. fortis* на территории Амурской области, а также подтвердили циркуляцию VLAV в полевках *M. fortis* на территории Приморского края.

На Дальнем Востоке России носителями хантавирусной инфекции являются не менее 11 видов грызунов [6]. Среди них у дальневосточной полевки *Microtus fortis* выявлен один из наиболее высоких уровней инфицированности. Доля грызунов, в легочной ткани которых при обследовании был найден хантавирусный антиген, достигала 19,7%, а специфические антитела в сыворотках крови обнаруживают у 23,6% животных [2, 6]. В 1988 г. от *M. fortis*, отловленной на территории Хабаровского края, был изолирован штамм Mf43/KBRV-88, идентифицированный как новый вирус Хабаровск (KBRV) [4]. На основании изучения полной структуры генома хантавируса KBRV, а также его антигенных свойств, установлена уникальность данного вируса [4, 8]. В 1991 г. от *M. fortis* был изолирован штамм Mf252/KBRV-91, который значительно отличался от вируса KBRV [2]. Различие кодируемых аминокислотных последовательностей фрагмента белка G2 составляло 12%. Позднее при анализе вирусной последовательности S-сегмента генома РНК, полученной от инфицированной хантавирусом *M. fortis*, отловленной на территории Приморского края, также были выявлены значительные отличия изолята от KBRV [5]. Различие нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с вирусом KBRV составило 21 и 10%, что соответствует критерию различий двух генотипов. Это сделало возможным предположить, что дальневосточная полевка является носителем другого генотипа, отличного от KBRV, названного Владивосток (VLAV). Нами при генетическом исследовании материала от серопозитивных дальневосточных полевок, отловленных на других участках очаговой территории Приморского

края, на основании анализа М-сегмента генома было установлено значительное (22%) отличие в нуклеотидных последовательностях от KBRV [6]. Недавно на территории Бурятии установлена циркуляция VLAV в популяциях *M. fortis* и *Microtus oeconomus* [7], а исследования, проведенные на территории Китая и внутренней Монголии, позволили установить, что хантавирус VLAV циркулирует в популяциях *M. fortis*, а KBRV у *M. maximowiczii* [9].

В настоящем исследовании проведена характеристика геномов хантавирусов и митохондриальной ДНК его природных хозяев — полевок рода *Microtus*, отловленных на территории Дальнего Востока России.

Исследованы антиген- или серопозитивные образцы ткани легких 17 полевок рода *Microtus*, отловленных в 1997—2005 гг. на территории Приморского, Хабаровского краев и Амурской области. Суммарная РНК/ДНК выделена из ткани легких с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) и подвергнута анализу методом обратной транскрипции — полимеразно-цепной реакции (ОТ—ПЦР) для выявления фрагментов М-сегмента генома. Для анализа выбран фрагмент гена гликопротеина G2, соответствующий нуклеотидным позициям 2735—2993 штамма KBRV Mf43. Амплификация проводилась методом ОТ—ПЦР в одной пробирке с использованием набора Titan (Roche GmbH, Germany). Образцы легких ОТ—ПЦР-позитивных грызунов использовали для анализа митохондриальной ДНК (мтДНК) на высоковариабельном участке, примыкающем к региону начала репликации тяжелой цепи мтДНК (участок D-петли). ПЦР-продукты разделены методом электрофореза в 1,2% агарозном геле, фрагменты подходящего размера вырезаны из геля и очищены с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany). ПЦР-продукты секвенированы на автоматическом анализаторе Applied Biosystem 310. Полученные последовательности анализировали путем сравнения с известными последовательностями хантавирусов из банка данных GenBank. Для филогенетического анализа различий между выделенными изолятами и известными хантавирусами использован метод объединения соседних последовательностей. Индексы поддержки получены для 1000 повторов анализа. Установленные нами нуклеотидные последовательности хантавирусов зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами EU360905—EU360908.

Таблица

Результаты генетического и серологического тестирования образцов легких от полевок рода *Microtus*.

№ образца	Год отлова	Место отлова	Титр		Генотип	
			антигена	антител	вируса	грызуна
18650	1997	Городечное Приморского кр.	+	—	VLAV	<i>M. fortis</i>
26648	1997	Спасский р-н Приморского кр.	+	—	VLAV	<i>M. fortis</i>
605	2002	Черняево Амурской обл.	—	1:80	KBRV	<i>M. maximowiczii</i>
612	2002	Черняево Амурской обл.	1:4	1:20	KBRV	<i>M. maximowiczii</i>
657	2002	Сковородино Амурской обл.	1:16	1:80	KBRV	<i>M. maximowiczii</i>
679	2002	Сковородино Амурской обл.	+	—	KBRV	<i>M. maximowiczii</i>
28179	2005	Спасский р-н Приморского кр.	+	1:20	VLAV	<i>M. fortis</i>
1151	2005	Благовещенск Амурской обл.	-	1:20	VLAV	<i>M. fortis</i>

Для анализа генетической вариабельности хантавирусов, циркулирующих в полевках рода *Microtus*, нами были проанализированы 17 вирусосодержащих образцов (полевых штаммов). Нуклеотидные последовательности М-сегмента вирусного генома (позиции 2735–2993) были выявлены в 8 образцах (табл.).

В сравнительный анализ, помимо представителей всех известных, были включены опубликованные в 2008 г. последовательности штаммов вирусов KBRV и VLAV из Китая и Бурятии [7, 9]. Результаты анализа показали, что в четырех образцах нами были выявлены последовательности вируса KBRV, а в оставшихся четырех образцах — вируса VLAV. Все штаммы KBRV были близки прототипному штамму KBRV Mf43. Следующим по степени близости являлся штамм TOPV, изолированный от сибирского лемминга; различия составляли 17,8–22,8% для нуклеотидных и 8,6% — для аминокислотных последовательностей. Вариабельность геномов KBRV находилась в пределах 2,3–11,4%, при этом аминокислотные последовательности всех штаммов на выбранном участке оказались полностью идентичны прототипному вирусу. Вариабельность геномов VLAV составляла 0,9–11,0%, аминокислотные последовательности были идентичны друг другу. Установленные последовательности оказались наиболее близки (4,1–11,9% нуклеотидных и 0% аминокислотных различий) последовательностям штаммов VLAV из города Fusong, расположенного в Китае в 400 км от Владивостока. В тоже время различие с географически более удаленными штаммами VLAV из Бурятии достигало 16,9–19,6% для нуклеотидных и 3,8% — для аминокислотных последовательностей. Нами установлено значительное различие между хантавирусами VLAV и KBRV, циркулирующими на одной территории. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности отличались на 20,5–24,7 и 11,3% соответственно. Как и в случае с вирусом KBRV, различие нуклеотидных последовательностей VLAV по сравнению со штаммом TOPV было меньше и составляло 17,8–22,8%, различие аминокислотных последовательностей — 10,0%.

Для определения генетического родства изучаемых штаммов с ранее известными хантавирусами на основе М-сегмента вирусного генома реконструирована его филогения (рис.). На филогенетическом

древе все штаммы KBRV образуют единую группу с высоким индексом поддержки, что говорит о единстве их происхождения. Внутри группы штаммы KBRV объединяются по географическому признаку, а вся группа KBRV объединена на филогенетическом древе с TOPV. Более сложная картина филогенетических взаимосвязей выявлена для штаммов VLAV. Эта группа, имеющая высокий уровень поддержки, разделена на две подгруппы. В первую вошли объединенные по географическому принципу штаммы из Приморского края и Китая (Городечное и Fusong), из Приморского края и Амурской области (Спасск и Благовещенск). Штаммы из Бурятии образовали вторую подгруппу. Таким образом, анализ вирусных последовательностей М-сегмента генома четко показывает, что хантавирусы KBRV и VLAV представляют две различных ветви на филогенетическом древе и являются двумя различными генотипами.

Большинство имеющихся в настоящее время данных согласуются с гипотезой о параллельной эволюции хантавирусов и их природных хозяев. Предшествующие данные о циркуляции двух генотипов вируса у *M. fortis* противоречат этой гипотезе и ставят вопрос о более точной идентификации природных хозяев генотипов KBRV и VLAV. Ранее отмечалось, что прототипный штамм вируса KBRV был изолирован от дальневосточной полевки *M. fortis*, отловленной в Хабаровском крае. Из того же вида носителя в Приморском крае были выявлены вирусные последовательности VLAV [3, 5].

Для более точного определения вида полевок рода *Microtus* проведено независимое зоологическое определение вида носителей и анализ их мтДНК. Нами получены и секвенированы фрагменты мтДНК длиной 403 нуклеотида. Межвидовая дивергенция между различными видами грызунов в пределах исследованного участка Д-петли варьировала от 5,5 до 13,7%. При этом внутривидовая вариабельность данного участка ДНК не превышает 4,5%. При сравнительном анализе мтДНК животных, являющихся носителем вируса KBRV, и животных, у которых был выявлен генотип VLAV, оказалось, что различие составляет более 9%. При этом различие мтДНК носителей VLAV не превышало 1,0%, а различие мтДНК полевок — носителей

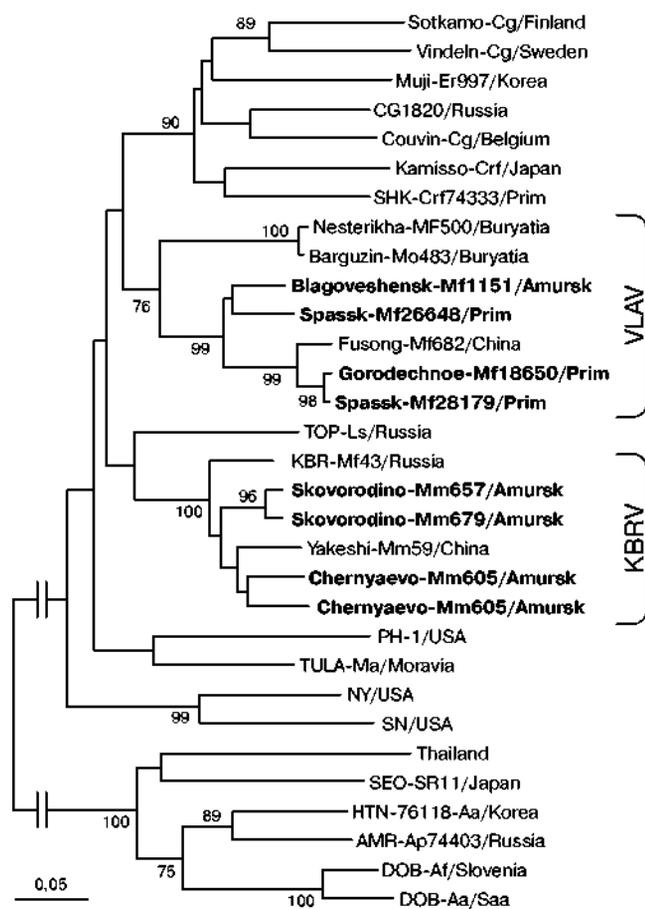


Рис. Филогенетическое древо, построенное на основе нуклеотидной последовательности фрагмента М-сегмента генома хантавирусов, позиции 2735–2993. Жирным шрифтом выделены исследованные нами полевые штаммы. Показаны индексы поддержки больше 70.

KBRV составляло 1,0–2,9%. Полученные данные свидетельствуют о том, что различающиеся генотипы хантавирусов KBRV и VLAV также циркулируют в двух различных носителях. Определение видовой принадлежности полевок на основании анализа признаков черепа и рисунка жевательной поверхности коренных зубов [1], а также мтДНК показало, что штаммы KBRV выявлены от полевок Максимовича (*M. maximowiczii*), а VLAV — от дальневосточных полевок (*M. fortis*).

Ранее, при отсутствии доступных для сравнения последовательностей М-сегмента генома VLAV, мы предположили наличие нового, генетически отличающегося вируса в *M. fortis*, отловленных в окрестности п. Городечное [3]. Настоящее исследование, а также появление последовательностей М-сегмента VLAV в GenBank, позволило уточнить ранее полученные данные. Сравнение установленных и выявленных ранее последовательностей хантавируса от *M. fortis*, отловленных в окрестности п. Городечное, выявило их высокое родство (0–0,9% различий) и принадлежность к последовательностям VLAV. Циркуляцию VLAV в *M. fortis* и циркуляцию KBRV в *M. maximowiczii* подтвердили данные зарубежных исследователей [7, 9]. Ранее присутствие хантавирусной инфекции у *M. ma-*

ximowiczii было описано российскими учеными на территории Читинской области, однако вирус не был идентифицирован. Наша работа впервые выявила циркуляцию вируса KBRV в полевах *M. maximowiczii* и VLAV — в полевах *M. fortis* на территории Амурской области, а также подтвердила циркуляцию VLAV в полевах *M. fortis* на территории Приморского края.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ВТЕР в рамках проекта МНТЦ 0805.2.

Литература

1. Громов И.М., Ембаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. — СПб.: Изд-во Зоол. ин-та РАН, 1995.
2. Иванов Л.И., Чижиков В.Е., Деконенко А.Е. и др. // Хантавирусы и хантавирусные инфекции / под ред. Р.А. Слоновой, В.А. Иванис. — Владивосток: Примпо-лиграфкомбинат, 2003. — С. 151–161.
3. Яшина Л.Н. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2006. — №3. — С. 78–81
4. Horling J., Chizhikov V., Lundkvist A. et al. // J. Gen. Virol. — 1996. — Vol. 77. — P. 687–694.
5. Kariwa H., Yoshimatsu K., Sawabe J. et al. // Virus Res. — 1999. — Vol. 59. — P. 219–228.
6. Kosoy M., Slonova R., Mills J. et al. // J. Vect. Ecol. — 1997. — Vol. 22. — P. 52–63.
7. Plyusnina A., Laakkonen J., Niemimaa J. et al. // Virol. J. — 2008. — Vol. 5. — P. 4.
8. Vapalahti O., Lundkvist A., Fedorov V. et al. // J. Virol. — 1999. — Vol. 73. — P. 5586–5592.
9. Zou Y., Wang J.B., Gaova H.S. et al. // J. Med. Virol. — 2008. — Vol. 80. — P. 680–688.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

HANTA VIRUSES, CIRCULATING IN MICE *MICROTUS FORTIS* AND *MICROTUS MAXIMOWICZII*

L.N. Yashina¹, L.I. Ivanov², R.A. Slonova³, G.G. Kompanets³, V.V. Gutarov¹, T.V. Kushnareva³, N.P. Vysochina², S.A. Abramov⁴, T.A. Dupal¹, N.M. Puhovska², N.I. Zdanovska²

¹State scientific centre of virology and biotechnologies «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk area), ²Khabarovsk antiplague station Rospotrebnadzor, ³Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok), ⁴Institute of systematization and ecology of animals Siberian branch of the Russian Academy of Science (Novosibirsk)

Summary — By the method of a return transcription - polymerase chain reaction with the subsequent 8 strains of Hantavirus, allocated from mice sorts *Microtus* from Far East region of Russia have been investigated. Independent zoological definition of a kind of rodents of carriers and the analysis of mitochondrial DNA have been done. The comparative analysis established nucleotide sequences of fragments of M of a segment virus of genome of the Hantavirus and m-DNA of mice with nucleotide sequences submitted in database GenBank, has revealed circulation of two genotypes KBRV and VLAV in two kinds of rodents — carriers of viruses. Our researches for the first time have revealed circulation of genotypes KBRV in mice *M. maximowiczii* and VLAV in mice *M. fortis* in territory of the Amur area, and also have confirmed circulation VLAV in mice *M. fortis* in territory of Primorsky Krai. **Keywords:** hantavirus infection, mice, genotype.