

8. Heiz F. X., Allison S. L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 4. — P. 450—455.
9. Helmy K. Y., Katschke K. J. Jr., Gorgani N. N. et al. CR1g: A macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens // *Cell.* — 2006. — Vol. 124. — P. 915—927.
10. Khozinsky V. V., Semenov B. F., Gresikova M. et al. Role of macrophages in the pathogenesis of experimental tick-borne encephalitis in mice // *Acta Virol.* — 1985. — Vol. 29. — P. 194—202.
11. Kopecky J., Grubhoffer L., Tomkova E. Interaction of tick-borne encephalitis virus with mouse peritoneal macrophages. The effect of antiviral antibody and lectin // *Acta Virol.* — 1991. — Vol. 35. — P. 218—225.
12. Shangguan T., Siegel D. P., Lear J. D. et al. Morphological changes and fusogenic activity of influenza virus hemagglutinin // *Biophys. J.* — 1998. — Vol. 74. — P. 54—62.
13. Wu L., Morahan P. S. Macrophages and other nonspecific defenses: role in modulating resistance against herpes simplex virus // *Curr. Top. Microbiol.* — 1992. — Vol. 179. — P. 89—110.

Поступила 16.03.07

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 578.833.29:578.41.083.3:577.21(470.46)

В. И. Журавлев, С. Б. Гаранина, В. В. Кабин, Г. А. Шипулин, А. Е. Платонов

Выявление нового природного очага вируса Добрава в Астраханской области

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; ФГУЗ Астраханская ПЧС

С использованием молекулярно-генетических методов впервые выявлен природный очаг вируса Добрава в аридной зоне Астраханской области. Методом ПЦР исследовано 389 образцов суспензий легочной ткани от грызунов 9 видов. В 35 пробах — от 22 полевых мышей, 8 гребенчиковых песчанок, 4 обыкновенных полевков, и 1 домовой мыши — выявлена РНК хантавирусов. В результате секвенирования была определена таксономическая принадлежность 18 новых изолятов к виду Добрава и 1 изолята к виду Пуумала, хотя новые изоляты Добрава значительно отличались по нуклеотидной последовательности М- и S-сегментов генома от всех известных штаммов этого вируса. Инфицированные грызуны были выявлены в 3 из 4 районов области, в степной, полупустынной зонах и интразональных станциях Волго-Ахтубинской поймы. Обнаружен высокий уровень (до 12%) инфицированности хантавирусами гребенчиковой песчанки, типичном представителе пустынных и полупустынных экосистем.

Ключевые слова: хантавирусы, Добрава, Пуумала, ПЦР, секвенирование, природный очаг, аридная зона

Detection of a new natural virus focus Dobrava in the Astrakhan Region

Zhuravlev V. I., Garanina S. B., Kabin V. V., Shipulin G. A., Platonov A. Ye.

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; Astrakhan Plague Station

A natural focus of Dobrava hantavirus was first revealed in an arid zone of the Astrakhan Region, by using molecular genetic methods. A polymerase chain reaction was employed to examine 389 lung tissue suspension samples taken from 9 species. Hantavirus RNA was found in 35 samples from 22 field mice (*Apodemus agrarius*), 8 tamarisk gerbils (*Meriones tamariscinus*), 4 common voles (*Microtus arvalis*), and 1 house mouse (*Mus musculus*). Sequencing determined the taxonomic affiliation of 18 new isolates to the Dobrava species and 1 isolate to the Puumala species although the new Dobrava isolated greatly differed from all known strains of this virus in the nucleotide sequence of the genomic M and S segments. Hantavirus-infected rodents were found in 3 of 4 districts of the Astrakhan Region, located in the steppe and semidesert zones and at the intrazonal stations of the Volga-Akhtuba flood-lands. The high (up to 12%) hantavirus infection rates were ascertained in a tamarisk gerbil, the typical inhabitant of desert and semidesert ecosystems.

Key words: hantaviruses, Dobrava, Puumala, polymerase chain reaction, sequencing, natural focus, arid area

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) представляет собой острую вирусную инфекцию зоонозой природы. На территории Российской Федерации клинически диагностируемые формы ГЛПС вызывают хантавирусы — Пуумала, Хантаан, Добрава, Сеул (семейство *Bunyaviridae*, род *Hantavirus*). В России регистрируется от 5 до 20 тыс. случаев ГЛПС в год, при этом максимальные уровни заболеваемости отмечаются в регионах Приволжского Федерального округа. На европейской части России наиболее активные очаги ГЛПС ассоциированы с хантавирусом Пуумала и расположены в зоне широколиственных и смешанных лесов Среднего Поволжья и Предуралья — оптимальном ареале рыжей полевки [2]. Наиболее тяжелые формы инфекции с летальностью 5—10%, связанные с вирусами Хантаан и Сеул, регистрируются преимущественно в дальневосточных регионах. Ареал вируса Добрава, вызывающего среднетяже-

лые и тяжелые формы ГЛПС [6—8], и его эпидемиологический потенциал на территории Российской Федерации практически не изучены.

По данным Роспотребнадзора РФ в последние годы наблюдается устойчивая тенденция роста заболеваемости ГЛПС и расширение ареала хантавирусов. При этом регистрируются вспышки хантавирусной инфекции, ассоциированные с новыми малоизученными геновариантами хантавирусов. Такие вспышки отмечены в остепненных и лугополевых станциях Центрального Черноземного региона, степной зоне Оренбургской области, там же зафиксированы максимальные индексы инфицированности хантавирусом обыкновенных полевков и мышей рода *Apodemus* [1].

До недавнего времени Астраханская область считалась неэндемичным по ГЛПС регионом. Ландшафтно-географические характеристики области (70% территории занимают степи и полупус-

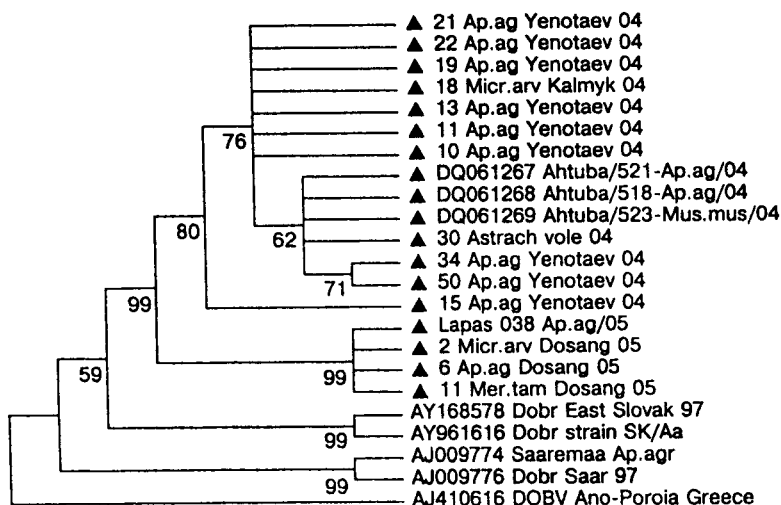


Рис. 1. Дендрограмма, построенная по 270 нуклеотидам гена G-2 (M-сегмента) новых изолятов вируса Добрава из Астраханской области (помечены треугольником) и штаммов вируса Добрава, зарегистрированных в базе данных GenBank (программа Mega 3.1, метод Minimum Evolution).

тени), отсутствие лесных массивов и низкая численность основных видов грызунов-носителей хантавирусов обуславливало отсутствие интереса к проведению скрининговых исследований на наличие природных очагов хантавирусов. Климатические, экологические и социально-экономические изменения последних лет обострили эпидемиологическую ситуацию в регионе по целому ряду опасных вирусных инфекций. Впервые в 1997 г. А. М. Бутенко и соавт. исследовали методом иммуно-ферментного анализа (ИФА) 511 суспензий легких от диких грызунов из Астраханской области на наличие антигенов хантавирусов и выявили 4 положительные пробы [3]. Дальнейшие исследования в этом направлении не проводились, до сих пор территория области официально считается неэндемичной по хантавирусам, исследования клинического материала от больных с симптомами острой почечной недостаточности и лихорадкама неустановленной этиологии на ГЛПС не проводятся.

Учитывая трудности изоляции хантавирусов на культуре клеток, в настоящее время молекулярно-генетические методы являются наиболее эффективными подходами для прямой детекции этих вирусов в природе [5] и в некоторых случаях единственным способом быстрой идентификации и характеристики новых штаммов [9].

Цель работы заключалась в проведении скрининговых исследований материала от грызунов на наличие хантавирусов с использованием молекулярно-генетических методов; в оценке эффективности разработанных лабораторных методов для обнаружения новых природных очагов хантавирусов, а также перспективы их использования для генотипирования выявленных природных изолятов.

Материалы и методы

Отлов мышевидных грызунов и мелких млекопитающих проводили в 4 административных районах Астраханской области — Енотаевском, Харабалинском, Красноярском и Лиманском. Места поимок в 2004—2005 гг. были приурочены к степной и полупустынной ландшафтно-географиче-

ским зонам, а также к интразональным станциям Волго-Ахтубинской поймы. В исследование включены пробы от 389 диких грызунов 9 видов (180 полевых мышей, 10 домашних мышей, 23 обыкновенных полевков, 33 общественных полевков, 136 гребенщиковых песчанок, 1 полуденной песчанки, 4 землероек и 2 пегих путораков).

Для исследования методом ПЦР приготовили 10% суспензии легочной ткани грызунов. В работе использовали универсальные праймеры, выбранные на основе S- и M-сегментов генома хантавирусов. Эффективность праймеров была установлена ранее при работе с полевым и клиническим материалом [4].

Положительные пробы с высокой вирусной нагрузкой, не требующие дополнительных приемов очистки после амплификации в ПЦР, были секвенированы. Секвенирование осуществляли методом Сэнджера на секвенаторе GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) с набором ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, согласно инструкции изготовителя. Для секвенирования использовали те же самые праймеры, что и для ПЦР.

Филогенетический анализ выявленных нуклеотидных последовательностей — фрагментов S- или M-сегментов, осуществляли с помощью программы Mega 3.1. Для сравнения новых изолятов с известными штаммами были выбраны полные нуклеотидные последовательности S-, M-сегментов хантавирусов из базы данных GenBank. Список изолятов для сравнения включал следующие штаммы вируса Добрава: Kurkino, Russia (AJ 131673); Goryachiy Klyuch, Russia (AF 442622); Saaremaa Aa1403 (AJ 616854); East Slovakia 862Aa (AJ269550, AY168578); Dobrava human Germany (AY533117); Kocevje Af (AJ251997); Dobrava SK/Aa (AY961616); Dobrava 3970/87 (L41916); Saaremaa 90 Aa (AJ0099776); Saaremaa160V (AJ009774); Ano-Poroia Af19 (AJ410616), а также штаммы вируса Пуумала: CG1820, Russia (M32750); CG17/Baskiria-2001 (AF442613); CG230/Samara (AF411449); Udmurtia/458Cg/88 (Z30707); Udmurtia/444Cg/88 (Z30706); Puu/Kazan (Z84204); CRF366 Omsk (AF367071); Kolodozero, Karelia (PVI238789).

Результаты

В результате исследования методом ПЦР суспензий легочной ткани от 389 грызунов в 35 пробах была выявлена РНК хантавирусов. Положительными оказались пробы от 8 (5,9%) гребенщиковых песчанок, от 22 (12,2%) полевых мышей, от 4 (17,4%) обыкновенных полевков и от 1 (10,0%) домашней мыши. Часть положительных проб использовали для идентификации генотипа путем секвенирования по S- и/или M-фрагментам генома.

В результате секвенирования 18 положительных образцов и анализа нуклеотидных последовательностей была установлена их таксономическая принадлежность к виду Добрава. Все новые РНК-изоляты, выявленные у полевых мышей, обыкновенных полевков, гребенщиковых песчанок и домашней

мышь, независимо от источника выделения (вида грызуна) характеризовались высокой гомогенностью. Уровень их гомологии составил 97–100%. В то же время при сравнении их нуклеотидных последовательностей с классическими высоковирулентными штаммами Добрава (Апо-Рогойя и Goryachiy Klyuch), выделенными от желтогорлых мышей, а также с менее вирулентными европейскими геновариантами этого вируса (Saaremaa — от полевых мышей), был установлен значительный уровень отличий, составивший, в среднем 25 и 15% соответственно (рис. 1, 2). Наибольшее (90%) сходство (по 420 нуклеотидам S-сегмента) новых изолятов отмечено со штаммом Куркино, выделенным в Тульской области (рис. 2). По 270 нуклеотидам M-сегмента наибольший уровень (88%) гомологии установлен со штаммом East Slovakia (рис. 1).

В результате секвенирования, помимо идентификации 18 проб, отнесенных к вирусу Добрава, была установлена таксономическая принадлежность одного изолята от гребенщиковой песчанки к вирусу Пуумала. При сравнении его по 420 нуклеотидам S-сегмента с известными изолятами этого вида была выявлена близость к штаммам, циркулирующим в Волго-Уральском регионе, при этом максимальный уровень (96%) гомологии отмечен с удмуртскими штаммами. Наименьшее (80%) сходство отмечалось со штаммами, выделенными от грызунов из Республики Карелия и Омской области.

Обсуждение

С использованием молекулярно-генетических методов впервые было установлено, что на территории Астраханской области существует природный очаг хантавирусов. При этом наблюдается широкая распространенность новых изолятов вируса Добрава, циркуляция которых выявлена в 3 ландшафтно-географических зонах области — степной, полупустынной и пойменной. Высокий уровень инфицированности хантавирусами установлен у грызунов 4 видов (полевой мышь, гребенщиковой песчанки, обыкновенной полевки и домовая мышь), что не позволяет сделать однозначного заключения о доминирующем здесь виде — вирусоносителе. Важно отметить, что выявление нового природного очага вируса Добрава расширяет представление о его ареале, который на территории Российской Федерации практически не изучен. Проведенный филогенетический анализ показал, что циркулирующие на территории области геноварианты вируса Добрава значительно отличаются от всех известных вариантов этого вируса, в том числе и европейских.

Единичные позитивные находки вируса Пуумала в пробах грызунов не позволяют сделать заключения об активности его очага.

Впервые хантавирусы были выявлены в новом виде грызуна — гребенщиковой песчанке *Merionus tamariscinus* (семейство *Cricetidae*), типичном представителе пустынных и полупустынных экосистем. При этом уровень их зараженности варьировал на различных обследованных участках от 5,9 до

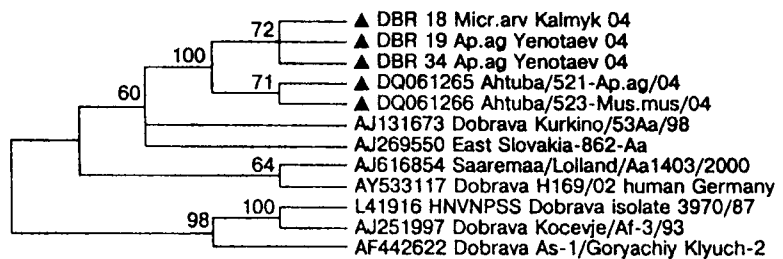


Рис. 2. Дендрограмма, построенная по 420 нуклеотидам гена N (S-сегмента) новых изолятов вируса Добрава из Астраханской области (помечены треугольником) и штаммов вируса Добрава, зарегистрированных в базе данных GenBank (программа Mega 3.1, метод Minimum Evolution).

12,5%, что значительно превышает известные показатели инфицированности для случайно вовлеченных в пероцесс носительства видов мелких млекопитающих. Особый интерес представлял факт обнаружения изолятов хантавирусов 2 видов — Пуумала и Добрава — в популяции гребенщиковой песчанки на ограниченной территории одного из биотопов в аридной зоне Волго-Уральских песков.

Очевидно, что для изучения структуры новых природных очагов хантавирусов Добрава и Пуумала на территории Астраханской области, выявления всего спектра циркулирующих здесь геновариантов, определения доминирующих видов-вирусоносителей необходимо комплексное обследование региона с привлечением всего арсенала существующих методик — вирусологических, иммунологических, молекулярно-генетических.

Следует отметить, что ежегодно в Астраханской области наблюдается до 1000 случаев острых вирусных инфекций неустановленной этиологии. Отсутствие официально регистрируемой заболеваемости ГЛПС в области может быть обусловлено рядом причин, включающих недостаточный опыт врачей в постановке диагноза и неудовлетворительное состояние лабораторной базы для специфического подтверждения диагноза ГЛПС. Возможно также, что отсутствие вспышек заболеваемости ГЛПС в этом регионе связано со стабильно низкой численностью мышевидных грызунов, благодаря проведению в 1950–1980 гг. широкомасштабных истребительных мероприятий в рамках борьбы с возбудителями чумы и туляремии, а также постоянного эпизоотологического надзора за популяциями мышевидных грызунов.

Несмотря на то что иммунологические методы являются оптимальными при эпизоотологическом мониторинге, позволяют проводить массовый скрининг проб за короткое время, их информативные возможности для идентификации и характеристики новых вариантов хантавирусов, циркулирующих в природе, сильно ограничены. Настоящее исследование показало, что молекулярные методы наиболее эффективны, как для выявления новых природных очагов хантавирусов, так и для быстрой идентификации циркулирующих в природе штаммов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балакирев А. Е., Башкирцев В. Н., Седова Н. С. и др. Эпизоотология геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Центральном Черноземье // *Вопр. вирусол.* — 2006. — № 5. — С. 28–32.

2. Бернштейн А. Д., Алекина Н. С., Копылова Л. Ф. и др. Особенности проявления лесных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом, расположенных в оптимальном ареале рыжей полевки // РЭТ инфо. — 2003. — № 3. — С. 11—17.
3. Бутенко А. М., Быченкова Т. А., Вышемирский О. И. и др. Дальнейшее изучение циркуляции хантавирусов в Российской Федерации // Вопр. вирусол. — 1997. — № 2. — С. 74—76.
4. Гарицина С. Б., Журавлев В. И., Шипулин Г. А. и др. Перспективы использования молекулярно-генетических методов для ранней диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом и оценки эпизоотической активности природных очагов хантавирусов // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2005. — № 6. — С. 37—41.
5. Деконенко А. Е., Ткаченко Е. А. Хантавирусы и хантавирусные инфекции // Вопр. вирусол. — 2004. — № 3. — С. 40—44.
6. Avsik-Zupanc T., Xiao S.-Y., Stojanovic R. et al. Characterisation of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia // J. Med. Virol. — 1992. — Vol. 38. — P. 132—137.
7. Heyman P., Vervoort T., Colson P. et al. A major outbreak of hantavirus infection in Belgium in 1995 and 1996 // Epidemiol. Infect. — 1999. — Vol. 122, N 3. — P. 447—453.
8. Papa A., Johanson A. M., Stockton P. C. et al. Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece // J. Med. Virol. — 1998. — Vol. 55. — P. 321—327.
9. Plyusnin A. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy // Arch. Virol. — 2002. — Vol. 147, N 4. — P. 665—682.

Поступила 27.03.07

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008
УДК 578.832.1.-83.2

В. Т. Иванова¹, Я. Е. Курочкина¹, В. Н. Буравцев², А. В. Николаев², А. В. Тимофеева³, Л. А. Баратова³

Взаимодействие вирусов гриппа А и В с углеродсодержащим сорбентом

¹ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, ²Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, ³НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Исследование показало, что вирусы гриппа А и В активно взаимодействуют с сорбентом, полученным из модифицированного кислородсодержащего графита с помощью гидротермической обработки, независимо от антигенной структуры поверхностных белков. Сорбция вирионов происходила в широком диапазоне температур — от 8 до 34°C — в течение 15 мин и более. Титр вируса в растворе после взаимодействия с сорбентом уменьшался в 4—256 раз. Иммуобилизованные вирусы были способны взаимодействовать с гомологичными антителами и иммунными сыворотками. Десорбция вирусов с сорбента была крайне слаба. Кроме вирусов, на сорбент могли иммобилизоваться белки невирусной природы — белки аллантаической жидкости куриных эмбрионов, иммунной сыворотки, 1% бычий сывороточный альбумин.

Ключевые слова: вирусы гриппа, углеродсодержащий сорбент, иммуносорбент, десорбция вирусов

Interaction of influenza A and B viruses with a carbon-containing sorbent

V. T. Ivanova¹, Ya. Ye. Kurochkina¹, V. N. Buravtsev², A. V. Nikolayev², A. V. Timofeyeva³, L. A. Baratova³

¹D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, ²N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow; ³A. N. Belozersky Research Institute of Physicochemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The investigation demonstrated that influenza A and B viruses actively interacted with a sorbent obtained from modified oxygen-containing graphite via hydrothermal treatment irrespective of the antigenic structure of surface proteins. Virionic sorption occurred in a wide range of temperatures from 8 to 34°C for 15 min or more. After interaction with the sorbent, the titer of a virus decreased 4- to 256-fold. The immobilized viruses were able to interact with homologous antibodies and immune sera. Desorption of viruses with the sorbent was extremely slight. In addition to viruses, the proteins of nonviral nature - those of allantoic hen embryo liquid, immune serum, and 1% bovine serum albumin - could be immobilized to the sorbent.

Key words: influenza viruses, carbon-containing sorbent, immunosorbent, viral desorption

Широкое распространение вредных, токсических для людей веществ, патогенных микроорганизмов, в том числе и вирусов, ставит вопрос о дезактивации и удалении их из окружающей среды. Для удаления вирусов из растворов существует 2 методических подхода: ультрацентрифугирование и сорбция их на сорбенты, которыми могут быть углеродсодержащие вещества. В частности, активированный уголь является активным сорбентом для токсических веществ, присутствующих как в глазах, так и в жидкостях [8]. Различия в составе и способе получения угля могут определить и свойства последнего как сорбента. Вследствие этого представлялось важным исследовать в качестве сорбента другое углеродсодержащее вещество — графит, природный минерал с известным химическим составом, который ранее не использовали для сорбции патогенных микроорганизмов и вирусов. В качестве сор-

бируемого агента были взяты вирусы гриппа, обладающие наружной белковой оболочкой, с различными антигенными свойствами.

В данной работе представлены результаты изучения условий сорбции и десорбции вирусов гриппа А и В с сорбента, а также сорбции белков невирусной природы, в том числе противогриппозных антител из иммунных сывороток.

Материалы и методы

Для изучения взаимодействия вируса с сорбентом взяли эталонные и эпидемические штаммы вируса гриппа А (H1N1, H3N2) и В, изолированные в период с 1977 по 2005 г., с различной структурой и соответственно свойствами поверхностных белков, а также приготовленные к ним иммунные крысиные сыворотки. Исследовали вирусы гриппа А (H1N1) — А/Новая Каледония/20/99,