

Е.А.Билько<sup>1</sup>, С.Б.Гаранина<sup>1</sup>, Н.И.Миронова<sup>2</sup>, С.А.Яковлев<sup>1</sup>, С.А.Щербакова<sup>1</sup>

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ РНК-ИЗОЛЯТОВ ХАНТАВИРУСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>2</sup>МУЗ «Городская клиническая больница № 2 им. В.И.Разумовского», Саратов, Российская Федерация

С целью получения данных о внутривидовом разнообразии хантавирусов, циркулирующих на территории Саратовской области, проведено молекулярно-генетическое исследование полевого и клинического материала. Методом ПЦР РНК хантавирусов была обнаружена в 25 пробах от мелких млекопитающих и 15 пробах крови от людей с диагнозом ГЛПС. Секвенирование выделенных 14 РНК-образцов хантавирусов от грызунов и 3 РНК-образцов клинического материала позволило определить их таксономическую принадлежность к вирусу Пуумала. В ходе филогенетического анализа РНК-изолятов установлено, что все они имеют высокий уровень гомологии между собой (99,8 %) и значительные отличия от известных штаммов Пуумала, распространенных на территории РФ (3,6–21 %). Таким образом, с помощью молекулярно-генетических методов подтверждена циркуляция вируса Пуумала на территории Саратовской области. Выявленная генетическая дистанционность Саратовских РНК-изолятов, в частности, открывает дальнейшие перспективы для определения места инфицирования больных ГЛПС.

*Ключевые слова:* ГЛПС, хантавирусы, вирус Пуумала, генотипирование, ПЦР.

Е.А.Bil'ko<sup>1</sup>, S.B.Garanina<sup>1</sup>, N.I.Mironova<sup>2</sup>, S.A.Yakovlev<sup>1</sup>, S.A.Shcherbakova<sup>1</sup>

## Results of Studies of Genetic Heterogeneity in Hantavirus RNA-Isolates, Found in the Territory of the Saratov Region

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>V.I.Razumovsky Municipal Clinical Hospital No 2, Saratov, Russian Federation

With a view to obtain the data on intraspecific diversity of Hantaviruses circulating in the territory of the Saratov Region, carried out has been molecular-genetic testing of the field and clinical material. Using PCR assay, Hantavirus RNA has been detected in 25 samples obtained from small mammals and 15 blood samples of HFRS patients. Sequencing of 14 hantavirus RNA-isolates from rodents and 3 RNA-isolates from clinical material has made it possible to identify their taxonomic appurtenance to Puumala virus. Phylogenetic analysis of RNA-isolates has revealed that all of them are characterized by high degree of homology in between themselves (99.8 %) and substantial distinction from the known Puumala strains, frequently occurring in Russia (3.6–21 %). Therewith, verified has been circulation of Puumala virus in the territory of the Saratov Region using molecular-genetic techniques. Identified genetic differences of Saratov RNA-isolates, in particular, opens a further prospect for allocation of the sites where people can contract HFRS infection.

*Key words:* HFRS, hantaviruses, Puumala virus, genotyping, PCR.

Саратовская область относится к числу тех территорий Российской Федерации, на которых, начиная с середины 80-х годов, выявлены активные природные очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). За весь период мониторинговых исследований очагов ГЛПС в области (с 1980 по 2011 год) официально было зарегистрировано 6283 случая заболеваний, из которых 31 со смертельным исходом. Изучению вопросов заболеваемости и природной очаговости ГЛПС в Саратовской области было посвящено немало научных работ, однако до сих пор не проводились исследования по изучению спектра циркулирующих в данном регионе хантавирусов, их видового и внутривидового разнообразия, в связи с чем отсутствует объективная оценка эпидемиологического потенциала природных очагов ГЛПС [1, 2, 4].

В настоящее время на территории Российской Федерации зарегистрирована циркуляция 8 видов

хантавирусов, из которых пять (Пуумала, Добrava, Хантаан, Сеул и Амур) являются патогенными для человека и вызывают клинически диагностируемые формы ГЛПС с различной степенью тяжести заболевания, уровнем летальности и интенсивностью эпидемических проявлений [3]. Учитывая высокую трудоемкость вирусологических методов исследования, молекулярно-генетические (ПЦР, секвенирование и др.) являются альтернативой, позволяющей решать задачи, связанные с идентификацией и типированием хантавирусов, циркулирующих в природных очагах, а также с быстрой этиологической расшифровкой заболевания без выделения вирусов на культуре клеток [5].

В связи с вышесказанным, целью работы явилось проведение лабораторных исследований полевого и клинического материала, полученного на территории Саратовской области в 2009–2012 гг., с

последующим генотипированием и характеристикой генетического разнообразия выделенных РНК-изолятов хантавирусов.

### Материалы и методы

Эпизоотологическое обследование проводилось на территории зеленой зоны Саратова с определением общей численности мелких млекопитающих, а также с характеристикой состояния популяций основных носителей хантавирусов – возбудителей ГЛПС. Место для исследований выбрано не случайно. Ретроспективный анализ литературных данных показал, что в 80–90-х годах прошлого столетия на этих территориях были зарегистрированы эпидемически активные природные очаги ГЛПС, отмечался высокий процент инфицированных грызунов, имели место массовые случаи заражения людей [1]. Кроме того, зеленая зона Саратова, как наиболее часто посещаемая горожанами зона отдыха, может быть отнесена к территориям повышенной эпидемиологической опасности для людей.

Всего в ходе работы было обследовано 16 точек в границах пригородного лесного массива – лесопарка «Кумысная поляна» и окрестностей п. Сокол. Выставлено 1600 давилок «Геро», в результате чего добыто 97 экз. грызунов 5 видов и 9 экз. насекомых 3 видов.

Лабораторные исследования суспензий органов мелких млекопитающих (смешанный пул легких и почек) на наличие антигенов и РНК хантавирусов проводили с использованием методов ИФА и ПЦР.

Помимо полевого материала, были проведены молекулярно-генетические исследования пятнадцати клинических образцов. Материал был получен от больных, находившихся в инфекционном отделении МУЗ «Городской клинической больницы № 2 им. В.И.Разумовского» (в 2012 г.) с диагнозом ГЛПС, поставленным на основании выявления специфических антител в сыворотках крови.

Для проведения иммуносерологических исследова-

ний использовали коммерческие тест-системы (производство ИПВЭ им. М.П.Чумакова, РАМН). Для молекулярно-генетических исследований применяли ПЦР со специфическими праймерами, а также разработанную ранее технологию генотипирования, включающую ПЦР с универсальными праймерами и прямое секвенирование ампликонов с использованием системы генетического анализа SEQ 8000 (Beckman coulter Inc.) [5]. Филогенетический анализ выделенных РНК-изолятов проводили по фрагменту гена N с помощью программы «Mega», методом сравнения Neighbor-Joining.

### Результаты и обсуждение

В ходе эпизоотологического обследования средняя численность мелких млекопитающих была охарактеризована как низкая и составляла 6,6 %. Почти повсеместно преобладали рыжие полевки, численность которых не превышала 3,1 %. Численность желтогорлых и малых лесных мышей была еще ниже – 1,4 %, а наиболее малочисленными оказались популяции обыкновенной полевки (0,2 %) и насекомоядных (0,6 %). Причиной подобной невысокой численности грызунов могла стать скудная кормовая база вследствие засушливого летнего периода 2009 г.

При лабораторном исследовании 106 проб полевого материала методами ПЦР и ИФА, положительными оказались 25, что составило 23,6 %. При этом в четырех пробах от рыжих полевок были обнаружены и хантавирусный антиген и вирусная РНК. Результаты исследований суспензий органов мелких млекопитающих на наличие хантавирусной РНК представлены в табл. 1.

Применение ПЦР-анализа в режиме реального времени с использованием видоспецифичных праймеров и зондов позволило определить принадлежность новых РНК-изолятов к виду Пуумала. РНК вируса ГЛПС регистрировали, в основном, в образцах, полученных от рыжих полевок. Инфицированность зверьков этого вида составляла 30,6 %. Помимо проб от рыжих полевок, положительными были образцы, полученные от малых лесных (18,2 %) и желтогорлых мышей (13,6 %), обыкновенных полевок (33,3 %) и обыкновенных бурозубок (33,3 %).

Дальнейшие исследования внутривидового разнообразия вновь выделенных РНК-изолятов, были проведены с помощью методики секвенирования ампликонов. Секвенирование ампликонов четырнадцати положительных образцов (13 – от рыжей полевки и 1 – от желтогорлой мыши) подтвердило их таксономическую принадлежность к вирусу Пуумала, а филогенетический анализ фрагмента гена N нуклеопротеина (426 п.н.) показал их высокую генетическую однородность – уровень гомологии составил 99,8 %.

Кроме полевого материала, методом ПЦР исследовали клинические образцы (кровь), полученные от пятнадцати человек в разгар болезни (на 3–14-й день

Таблица 1

Результаты выявления РНК хантавирусов в суспензиях органов мелких млекопитающих, отловленных в зеленой зоне Саратова

| Вид животного                                   | Кол-во добытых животных, абс. (%) | Кол-во положительных проб, абс. (%) |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Myodes glareolus</i> (рыжая полевка)         | 49 (46,2)                         | 15 (60,0)                           |
| <i>Microtus arvalis</i> (обыкновенная полевка)  | 3 (2,8)                           | 1 (4,0)                             |
| <i>Apodemus uralensis</i> (малая лесная мышь)   | 22 (20,8)                         | 4 (16,0)                            |
| <i>Apodemus flavicollis</i> (желтогорлая мышь)  | 22 (20,8)                         | 3 (12,0)                            |
| <i>Mus musculus</i> (домовая мышь)              | 1 (0,9)                           | 0                                   |
| Насекомоядные:                                  |                                   |                                     |
| - <i>Sorex araneus</i> (обыкновенная бурозубка) | 6 (5,7)                           | 2 (8,0)                             |
| - <i>Sorex minutus</i> (малая бурозубка)        | 2 (1,9)                           |                                     |
| - <i>Crocodyra suaveolens</i> (малая белозубка) | 1 (0,9)                           |                                     |
| <b>Итого</b>                                    | <b>106</b>                        | <b>25 (23,6)</b>                    |

Уровень генетических различий между штаммами вируса Пуумала из различных регионов РФ

| Территория              | Башкирия    | Удмуртия    | Оренбург    | Самара      | Воронеж/Липецк | Омск/Тюмень |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| Саратов                 | 0,070±0,012 | 0,036±0,009 | 0,062±0,011 | 0,057±0,012 | 0,119±0,019    | 0,210±0,019 |
| Республика Башкортостан |             | 0,072±0,011 | 0,063±0,011 | 0,055±0,010 | 0,140±0,017    | 0,230±0,018 |
| Республика Удмуртия     |             |             | 0,067±0,012 | 0,060±0,010 | 0,139±0,018    | 0,223±0,018 |
| Оренбург                |             |             |             | 0,035±0,008 | 0,140±0,018    | 0,217±0,019 |
| Самара                  |             |             |             |             | 0,188±0,018    | 0,230±0,019 |
| Воронеж/Липецк          |             |             |             |             |                | 0,215±0,018 |

от начала заболевания). Во всех образцах была выявлена РНК вируса Пуумала. Дальнейшие исследования трех отобранных для секвенирования проб показали, что РНК-изоляты от двух больных (один заболел в Аткарском районе области, второй – в Саратове) имеют высокое генетическое сходство между собой, а также с выделенными нами ранее РНК-изолятами от грызунов (уровень гомологии 99,8 %). Третий образец имел генетические отличия от двух других на уровне 0,8–1,0 %. Данный образец был получен от больной, которая выезжала за границы Саратовской области – в Камышинский район Волгоградской области, где, с учетом данных эпиданамнеза, вероятно и произошло ее заражение.

Проведенный филогенетический анализ установил близость Саратовских РНК-изолятов, выделенных от грызунов и людей, к штаммам вируса Пуумала, циркулирующим на территории Приволжского Федерального округа (ПФО). При сравнении со штаммами из Республик Удмуртия и Башкортостан, Самарской, Оренбургской и других областей ПФО (сиквенсы которых зарегистрированы в базе данных NCBI GenBank) выявлен средний уровень различий, который варьировал от 3,6 до 7,0 % (табл. 2). Наибольшая генетическая дистанцированность была отмечена при сравнении со штаммами вируса Пуумала, циркулирующими в регионах Центрального Федерального округа (Воронежской и Липецкой областях) и Западной Сибири (Тюменской и Омской областях). Уровень различий с изолятами из этих регионов составил 12 и 21 % соответственно (табл. 2). В ходе анализа аминокислотного состава в пределах секвенированного фрагмента N гена была определена маркерная аминокислотная последовательность (позиции 258-274), позволяющая дифференцировать Саратовские РНК-изоляты от штаммов из других регионов.

Таким образом установлено, что на территории Саратовской области циркулируют геноварианты вируса Пуумала, генетически дистанцированные от других известных штаммов этого вида хантавируса.

Актуальность проведения дальнейших исследований с помощью молекулярно-генетических подходов очевидна. Показана их высокая диагностическая эффективность, которая позволяет, в частности, решать проблемы, связанные с быстрой идентификацией возбудителя ГЛПС, этиологической расшифровкой заболевания, установлением места (региона, области), где произошло инфицирование человека, а также на основе полученной информации разработа-

вывать адекватные схемы проведения профилактических мероприятий с целью предотвращения эпидемических осложнений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заяц Н.А., Кузнецов В.И., Гаврилова И.Б., Сретенская Д.А., Царёва Т.Д., Бабиченко О.Е. Эпидемиологические и клинико-биохимические аспекты геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Саратовской области. *Усп. совр. естествознания*. 2008; 6:91–2.
2. Куличенко А.Н., Шульдяков А.А., Решетников А.А., Хорошун Е.В., Рамазанова К.Х., Сатарова С.А. Современные клинико-иммунологические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Саратовской области. *Инф. бол.* 2008; 2:21–3.
3. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Бернштейн А.Д., Окулова Н.М., Коротина Н.А., Гранквилевский Д.В., Морозов Г.В., Юничева Ю.В., Завора Д.Л., Баловнева М.В., Соцкова С.Е., Мутных Е.С., Смирнова М.С., Леонович О.А., Шевелев А.Б., Малкин Г.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России – проблема XXI века. *Вестник Российской академии естественных наук*. 2012; 1:48–54.
4. Рябова А.В., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Яковлев С.А., Шилов М.М., Попов Н.В. Очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом города Аткарска Саратовской области. *ЗНУСО*. 2014; 2:27–9.
5. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., Shipulin G.A. Genetic diversity and geographic distribution of Hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health*. 2009; 6–7:297–309.

## References

1. Zayats N.A., Kuznetsov V.I., Gavrilova I.B., Sretenskaya D.A., Tsareva T.D., Babichenko O.E. [Epidemiological and clinical-biochemical aspects of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Saratov Region]. *Uspekhi Sovrem. Estestvozn.* 2008; 6:91–2.
2. Kulichenko A.N., Shul'dyakov A.A., Reshetnikov A.A., Khoroshun E.V., Ramazanova K.Kh., Satarova S.A. [Modern clinical-immunological peculiarities of HFRS in the Saratov region]. *Inf. Bol.* 2008; 2: 21–3.
3. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Okulova N.M., Korotina N.A., Trankvilevsky D.V., Morozov G.V., Yunicheva Yu.V., Zavora D.L., Balovneva M.V., Sotskova S.E., Mutnykh E.S., Smirnova M.S., Leonovich O.A., Shevelev A.B., Malkin G.A. [HFRS in Russia – challenge of the XXI century]. *Vestnik Ros. Akad. Estestv. Nauk*. 2012; 1:48–54.
4. Ryabova A.V., Chekashov V.N., Matrosov A.N., Yakovlev S.A., Shilov M.M., Popov N.V. [HFRS foci in Atkarsk city of the Saratov region]. *Zdor. Nas. Sreda Obit.* 2014; 2: 27–9.
5. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., Shipulin G.A. Genetic diversity and geographic distribution of Hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health*. 2009; 6–7:297–309.

## Authors:

Bil'ko E.A., Garanina S.B., Yakovlev S.A., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapr@microbe.ru  
Mironova N.I. V.I. Razumovsky Municipal Clinical Hospital No 2. Saratov, Russian Federation

## Об авторах:

Билько Е.А., Гаранина С.Б., Яковлев С.А., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapr@microbe.ru  
Миронова Н.И. Городская клиническая больница № 2 им. В.И.Разумовского. Российская Федерация, Саратов.