

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО И ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ОЧАГОВ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ (ГЛПС)

Гаранина С.Б.¹, Корнеев А.Г.², Журавлев В.И.¹, Якименко В.В.³, Шипулин Г.А.¹, Платонов А.Е.¹

¹ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии, Роспотребнадзора, Москва, ²ГОУ ВПО Оренбургская государственная медицинская академия Росздрава, Оренбург, ³Омский НИИ природно-очаговых инфекций, Омск, Россия.

Хантавирусы, возбудители геморрагической лихорадки с почечным синдромом, широко распространены на территории Евразийского континента. Ежегодно регистрируется свыше 100 тысяч заболеваний людей, ассоциированных с патогенными вирусами Пуумала, Добrava, Сеул, Хантаан. Однако, реальное количество видов и подвидов, циркулирующих в природе в непосредственной близости к людям и представляющих для них потенциальную опасность, трудно представить.

Сложности культивирования хантавирусов затрудняют процесс идентификации и характеристики новых штаммов с использованием вирусологических методов. Данные о распространенности хантавирусов на территории Российской Федерации основаны преимущественно на серологических исследованиях и не дают представления о гетерогенности их популяций. Однако не вызывает сомнений существование ассоциативной связи тяжести заболевания ГЛПС с различными геновариантами хантавирусов.

Цель работы – обозначить роль и место молекулярных методов в системе эпидемиологического надзора за хантавирусными инфекциями.

Нами для выявления хантавирусов комплекса ГЛПС была разработана скрининговая мультиплексная ПЦР тест-система. Для выбора универсальных праймеров использовали нуклеотидные последовательности G2 и N генов, соответствующих M и S сегментам генома хантавирусов. Для охвата как можно большего числа геновариантов, циркулирующих в природе, были сконструированы несколько пар консенсусных и вырожденных праймеров, модифицированных инозином. Идентификацию выявленных в ПЦР РНК-изолятов осуществляли методом прямого секвенирования ампликонов 313 и (или) 475 н.п (M и (или) S-сегментов, соответственно).

С помощью разработанных молекулярных методик нами из клинического и полевого материала были выявлены свыше 200

РНК-изолятов хантавирусов, отнесенных к видам - Добрава, Пуумала, Тула и Топографов. Хантавирусы были обнаружены в различных ландшафтно-географических зонах Российской Федерации - в Удмуртии, Башкирии, Татарстане, Самарской, Липецкой, Воронежской, Оренбургской, Тюменской, Омской, Астраханской областях и Ямало-Ненецком округе.

С использованием молекулярно-генетических методов впервые было установлено существование природных очагов хантавируса Добрава на территории Астраханской области. При этом широкая распространенность изолятов этого вируса была выявлена в трех ландшафтно-географических зонах области – степной, полупустынной и пойменной. Высокий уровень инфицированности хантавирусами установлен у грызунов 3 видов – полевой мыши, гребенщиковой песчанки и обыкновенной полевки, что не позволяло сделать однозначного заключения о доминирующем здесь виде грызуна-вирусоносителя.

Впервые были выявлены положительные РНК-изоляты вируса Добрава в грызунах *Apodemus agrarius*, отловленных на территории Омской области. Ранее в этом регионе регистрировались случаи ГЛПС и антитела к вирусу Добрава у больных людей, которые одна-ко расценивали как завозные случаи заболевания.

При расследовании вспышки ГЛПС в Центральном Черноземье в 2007 была установлена её этиологическая связь с вирусом Добрава. Показана идентичность РНК изолятов вируса Добрава, выявленных в грызунах *Apodemus agrarius* и больных людях.

Важно отметить, что выявление новых изолятов вируса Добрава в Астраханской, Омской, Липецкой и Воронежской областях, расширяют представление о распространенности этого вируса на территории РФ, а также позволяют оценить гетерогенность существующих в природе популяций. Филогенетический анализ новых изолятов Добрава, выявленных нами на территории России в 2005-2007 гг., показал их значительные генетические отличия от известных штаммов, в том числе от Европейских вариантов подвида *Saaremaa* из Эстонии (IV гр.), зарегистрированных ранее в базе данных GenBank (Рис).

Обобщив имеющиеся к настоящему времени данные по изолятам вируса Добрава, выявленным на территории РФ, можно сделать заключение о существовании генетически изолированных групп, которые можно условно обозначить как Центральную, Южную и Западно-Сибирскую (Рис). Помимо этого, следует выделить стоящую особняком Причерноморскую группу, в которую следует отнести штаммы, выделенные Е.А. Ткаченко на территории Краснодарского края. Таким образом, на территории РФ в настоящее

время существует не менее 4-х генетически обособленных групп вируса Добрава. Геноварианты, входящие в эти группы, отличаются не только географической изолированностью, экологическими особенностями, связанными с доминирующими грызунами-носителями, но также своей вирулентностью и инвазивностью для людей. Причерноморская группа включает наиболее вирулентные геноварианты вируса Добрава (их основным носителем является кавказская лесная мышь *Apodemus Sylvaemus ponticus*, по своим свойствам они наиболее близки к штаммам *Dobrava/Belgrade* из Греции (V гр.).

В Центральную группу (I гр.) входят штаммы, широко распространенные в Липецкой, Воронежской, Орловской, Тульской и других областях Центрального региона, которые в природе связаны преимущественно с полевой мышью - *Apodemus agrarius*. С геновариантами этой группы были ассоциированы недавние вспышки ГЛПС, отмеченные в Центральном Черноземье в зимние периоды в 2001-02 гг. и в 2006-07 гг. Недостаточная изученность геновариантов Добрава, циркулирующих в Астраханской (II гр.) и Омской областях (III гр.), не позволяет сделать заключение об их потенциальной опасности для человека.

Филогенетический анализ показал, что уровень нуклеотидных различий между геновариантами Центральной, Южной и Западно-Сибирской групп в среднем составил 9.5-10%, при этом их отличия от геновариантов Добрава, относящихся к подвиду *Saaremaa* (IV гр.), варьировал в пределах 13-16%. Наибольшая генетическая удаленность наших изолятов из первых трех групп отмечена при сравнении со штаммами *Dobrava/Belgrade* (V гр.), уровень различий с ними составил 19-22%. (Рис).

Следует отметить наличие на территории РФ протяженных территорий, с давно существующими природными очагами ГЛПС, где исследования на хантавирусы ограничивались только серологическими методами. В связи с этим не установлен видовой спектр циркулирующих там хантавирусов, не изучена генетическая структура популяций вирусов, не определен их эпидемический потенциал. В то же время, существование дизъюнкции ареалов вируса Добрава и других хантавирусов, отмеченной на территории РФ, вызывает определенные сомнения и необходимость дополнительного изучения этого явления с привлечением современных методов, очевидна.

С использованием молекулярно-генетических методов нами также были выявлены и генетически охарактеризованы новые изоляты вируса Пуумала из природных очагов, расположенных в Самарской области, Западной Сибири - Тюмене, Омске, а также в

Предуралье - Удмуртии; Башкирии, Оренбурге. Уровень нуклеотидных различий между ними варьировал в пределах от 4 до 15%. Нами были выявлены и секвенированы 52 изолята вируса Пуумала из клинических образцов, полученных от больных во время вспышки ГЛПС в Удмуртии и Башкирии в 2004-2005 гг. В ходе работы была показана высокая диагностическая эффективность молекулярных методик для ранней диагностики ГЛПС.

Таким образом, помимо выявления и идентификации новых хантавирусов, современные методики могут быть использованы для изучения гетерогенности популяций хантавирусов в природе, характеристики эпидемической значимости штаммов, определения количественной нагрузки вируса в основных и второстепенных носителях для оценки уровня их опасности для людей. Несмотря на очевидные достоинства молекулярных методов и обозначенные перспективы использования в эпидемиологическом мониторинге, их применение затруднено и ограничено по ряду причин. Отчасти это связано с недостаточным ассортиментом коммерческих ПЦР тест-систем, отсутствием разработанных критериев оценки и интерпретации полученных результатов для характеристики эпизоотологической напряженности очага и прогнозирования эпидобстановки, а также с полным отсутствием нормативной базы, необходимой для использования молекулярных методик в лабораторной диагностике ГЛПС.

Рис 1. Дендрограмма, построенная по 270 нуклеотидам G-2 гена (M-сегмента) для новых РНК-изолятов вируса Добрава, выявленных на территории РФ в 2005-07 гг. (помечены маркером) и штаммов вируса Добрава, зарегистрированных в базе данных GenBank (программа Mega 3.1, метод Neighbor-Joining).

