

УДК: 616.61-002.151-036.22(471.56)

© А.Г. Корнеев¹, С.Б. Гаранина², В.И. Сергевнин³

¹ ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» МЗ РФ,
г. Оренбург, Россия

² ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора,
г. Саратов, Россия

³ ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия
им. ак. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ,
г. Пермь, Россия

ГЕНОТИПЫ ХАНТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ СРЕДИ ЛЮДЕЙ И МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СТЕПНЫХ И ЛЕСОСТЕПНЫХ ЗОН

Аннотация. Установлено, что на территории степных и лесостепных зон Оренбургской области как среди мелких млекопитающих, так и среди населения циркулирует вирус Пуумала. При низком уровне генетических различий изолятов внутри каждой зоны, изоляты из лесостепных и степных зон различаются между собой значительно. В лесостепных районах циркулируют генетические варианты вируса Пуумала, близкие хантавирусам из соседней Республики Башкортостан, а на территории степной зоны – генетически близкие штаммам вируса, выделенным на территории Самарской области.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, вирус Пуумала, лесостепные и степные зоны, генетические варианты.

© A.G. Korneev, S.B. Garanina, V.I. Sergevnin

Orenburg State Academy of Medicine,

Orenburg, Russia

Russian Health Research Institute for Plague Control "Microbe"

Saratov, Russia

Perm State Academy of Medicine named after ac. E.A. Vagner

Perm, Russia

HANTAVIRUS GENOTYPES CIRCULATING AMONG PEOPLE AND SMALL MAMMALS IN STEPPE AND FOREST-STEPPE ZONES

Abstract. It is established that Puumala – virus circulates in steppe and forest-steppe zones of Orenburg region both among small mammals and the population. In spite of insignificant genetic variations the isolates of forest-steppe and steppe zones differ significantly. Genetic variations of Puumala virus similar to hantavirus of Bashkortostan Republic circulate in forest-steppe zones, the variations similar to hantavirus of Samara region are found in the steppe zone.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome, Puumala-virus, forest-steppe and steppe zones, genetic variants.

Введение. В соответствии с ландшафтным районированием, предложенным А.А. Чибилевым [6], Оренбургская область разделена на 2 типа ландшафтных зон – лесостепной и степной, на которых регистрируется заболеваемость геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) [7]. Лесостепная зона занимает северную часть области и географически прилежит к Республике Башкортостан, лидирующей по уровню заболеваемости ГЛПС в России [5]. Большая часть южной части области – степная зона, граничащая на западе с Самарской областью, где так же регистрируется ГЛПС. Проявления эпидемического процесса ГЛПС среди населения выделенных ландшафтных зон Оренбургской области различны. Уровень заболеваемости в годы подъема на территории отдельных районов степной зоны области превышал 700 случаев на 100 тысяч населения [2]. Вместе с тем до настоящего времени проводились лишь единичные исследования по серотипированию возбудителя ГЛПС, циркулирующего среди мелких млекопитающих (ММП) природных очагов Оренбуржья [3], а генотипирование вируса, выделенного от больных ГЛПС и источников возбудителя инфекции, не проводилось вообще.

Цель работы – на примере Оренбургской области определить генетические варианты возбудителя ГЛПС, циркулирующие среди людей и мелких мышевидных грызунов степных и лесостепных зон.

Материалы и методы исследования. Для изучения генетического разнообразия хантавирусов были взяты пробы от 23 больных ГЛПС и от 21 ММП на территории лесостепной зоны, а также от 42 больных и 33 ММП на территории степной зоны Оренбургской области. Материалом исследования от больных была сыворотка крови, от ММП – суспензия легких. В лесостепной зоне изучаемыми территориями явились Кувандыкский и Тюльганский районы, в степной – Бузулукский, Илекский, Ташлинский, Переволоцкий, Новосергиевский и Оренбургский районы.

Для исследования были отобраны только те больные, которые согласно данным эпидемиологического анамнеза были инфицированы хантавирусами в районе своего проживания. Серологическое подтверждение диагноза ГЛПС у больных проводилось непрямым методом флюоресцирующих антител (НМФА) путем исследования парных сывороток крови на базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Оренбургской области» с помощью коммерческой тест-системы «Культуральный поливалентный диагностикум ГЛПС для непрямого МФА» (ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Москва).

Отлов ММП, определение вида и пола, приготовление суспензий легких проводили совместно с ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Оренбургской области». Определение хантавирусного антигена в суспензии легких ММП проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-системы «Хантагност». Постановку ИФА осуществляли согласно инструкции к тест-системе. При этом использовали классический принцип постановки твердофазного ИФА [4].

Молекулярно-генетические исследования проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на базе ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» (Москва) согласно усовершенствованной методике С.Б. Гараниной [1]. Все этапы анализа ПЦР выполняли с использованием реагентов производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии. Первоначально с помощью универсальных S-праймеров выявляли принадлежность изолятов к хантавирусам. Далее в исследованных пробах с помощью специфичных праймеров была идентифицирована РНК соответствующего вируса. После проведения ПЦР-исследований качественные амплифицированные образцы (с высокой РНК нагрузкой в пробе) для подтверждения принадлежности вируса к генотипу Пуумала были секвенированы. Отдельные фрагменты нуклеотидных последовательностей хантавирусов были охарактеризованы и зарегистрированы в базе данных «GenBank».

Генетические различия РНК-изолятов определяли на основе выявленных нуклеотидных последовательностей по фрагменту N-гена (426 н.п.). Уровень генетических различий выражали средним значением доли (%) несовпадающих нуклеотидов у разных изолятов, а также генетическим расстоянием (p-distance), рассчитанным с использованием программы «Mega». С помощью этой же программы проводили построение филогенетического дерева методом «Neighbor Joining» по алгоритму «Kimura 2-parameter» с выполнением «Bootstrap Test of Phylogeny» [8]. На основе выявленных различий проводили группировку РНК-изолятов.

Результаты генетического типирования хантавирусов на территории Оренбургской области были сопоставлены с данными генетического типирования вирусов Пуумала, проведенного С.Б. Гараниной [1] на территории смежных областей – Республики Башкортостан, граничащей с лесостепной зоной Оренбуржья, и Самарской области, граничащей со степной зоной Оренбуржья.

Результаты. С помощью универсальных праймеров из общего количества проб от больных из лесостепной зоны принадлежность выделенных РНК-изолятов к хантавирусам была подтверждена в 34,8 % случаев, из степной – в 26,2 %. РНК хантавирусов от ММП была выявлена в 42,9 % случаях от особей, отловленных в лесостепной зоне, и в 42,4 % – в степной. Все «положительные» пробы были от рыжих полевок (РП). При этом во всех положительных пробах на хантавирусы в сыворотке крови от больных людей и в суспензии легких РП из лесостепной и степной зон с помощью специфичных праймеров была выявлена РНК вируса Пуумала.

В выделенных РНК-изолятах вируса Пуумала в позиции 299–307 (SPDDIESPN) были определены аминокислотные последовательности, соответствующие вирусам Волго-Уральской группы, для которой данная последовательность является маркерной. Как известно, почти 90 % всех зарегистрированных случаев ГЛПС в России связаны с геновариантами

именно этой группы [1]. Все секвенированные пробы от людей (11) и ММП (13) были зарегистрированы в базе данных «GenBank» под номерами EU562997-563016 и EU652423- EU652426.

Проведенный филогенетический анализ позволил установить низкий уровень генетических различий (0,2 %) между РНК-изолятами вируса Пуумала, выявленными от больных и РП из лесостепной зоны Оренбургской области (таблица). Аналогичные результаты были получены и при анализе РНК-изолятов из степной зоны Оренбуржья. Уровень генетических различий изолятов составил лишь 0,3 %. В то же время изоляты из лесостепной зоны отличались от изолятов из степной зоны в среднем на 6,5 %. По фрагменту аминокислотной последовательности позиции 232–241 для хантавирусов из лесостепной зоны была характерной последовательность **PEKIREFMEK**, а для вирусов из степной зоны – **PERIREFMER** (жирным курсивом выделены различающиеся фрагменты). Таким образом, при низком уровне генетических различий изолятов хантавирусов из каждой зоны, изоляты из лесостепной и степной зон Оренбургской области значительно отличались.

Таблица

Уровень генетического различия (p-distance; %) между вирусами Пуумала, выделенными на разных территориях

Сравниваемые территории	Уровни генетического различия	
	p-distance	%
Лесостепная и степная зоны Оренбургской области	0,06±0,01	6,5
Лесостепная зона Оренбургской области и Республика Башкортостан	0,009±0,002	0,9
Степная зона Оренбургской области и Самарская область	0,03±0,01	3,0

Сопоставление РНК-изолятов, выявленных на территории Оренбургской области, с изолятами смежных территорий показало (таблица), что генетические варианты вирусов лесостепной зоны Оренбуржья были близки к изолятам из Республики Башкортостан, а изоляты степной зоны Оренбуржья – к изолятам Самарской области. Степень различий в первом

случае составила лишь 0,9 %, во втором – 3,0 %.

Выводы

1. На территории степной и лесостепной зон Оренбургской области как среди ММП, так и среди населения циркулирует вирус Пуумала. При низком уровне генетических различий изолятов внутри каждой зоны, изоляты из лесостепных и степных зон различаются между собой значительно.

2. В лесостепной зоне Оренбуржья циркулируют генетические варианты вируса Пуумала, близкие хантавирусам из соседней Республики Башкортостан, а на территории степной зоны – генетически близкие штаммам вируса, выделенным на территории Самарской области.

Список литературы:

1. Гаранина С. Б. Молекулярно-генетические методы и компьютерные технологии в системе эпидемиологического надзора за хантавирусными инфекциями: дисс. ... докт. биол. наук: 14.00.30, 03.00.06 / Науч.-исслед. ин-т эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. – М., 2009. – 239 с.

2. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке и состоянии здоровья населения Оренбургской области в 2005 году». – Оренбург.: Территориального управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Оренбургской области. Агентство «Пресса», 2006. – 124 с.

3. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке и состоянии здоровья населения Оренбургской области в 2012 году». – Оренбург.: Территориального управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Оренбургской области. Агентство «Пресса», 2013. – 167 с.

4. Иммунологические методы // Под ред. Г. Фримеля, Пер. с нем. А.П. Тарасова. – М., 1987. – 472 с.

5. Обзор эпидемиологической обстановки по зоонозным инфекциям в Приволжском федеральном округе в 1980–2011 гг. и прогноз ее развития в 2012 г. в субъектах, курируемых РосНИПЧИ «Микроб» / Л.Н. Дмитриева. – URL: http://www.microbe.ru/files/Obzor_zoonoz_PFO.pdf (дата обращения: 11.09.2013).

6. Чибилев А.А. Ландшафтно-типологическая карта Оренбургской области как основа оптимизации структуры земельного фонда / А.А. Чибилев, А.И. Климентьев, Е.В. Блохин. – Оренбург: Степи Евразии, 1997. – С. 152–153.

7. Шерстнев В.М. Особенности формирования природных очагов ГЛПС в различных ландшафтных провинциях: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Оренбург, 2005. – 24 с.

8. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. – 2004. – Vol. 5. – P. 150–163.

References

1. Garanina S.B. Molekulyarno-geneticheskie metody i komp'yuternye tekhnologii v sisteme epidemiologicheskogo nadzora za khantavirusnymi infektsiyami: diss. ... dokt. biol. nauk [Molecular – genetic methods and computer technologies in the system of epidemiological surveillance for Hantaan virus infections: thesis ... of Doc. of biol. Sciences]. Moscow, 2009. 239 p. (in Russian).

2. Gosudarstvennyy doklad «O sanitarno-epidemiologicheskoy obstanovke i sostoyaniya zdorov'ya naseleniya Orenburgskoy oblasti v 2005 godu» [State report «About the sanitary – epidemiological situation and health state of Orenburg region population in 2005»]. Orenburg: Pressa, 2006. 124 p. (in Russian).

3. Gosudarstvennyy doklad «O sanitarno-epidemiologicheskoy obstanovke i sostoyaniya zdorov'ya naseleniya Orenburgskoy oblasti v 2012 godu» [State report «About the sanitary – epidemiological situation and health state of Orenburg region population in 2012»]. Orenburg: Pressa, 2013. 167 p. (in Russian).

4. Immunologicheskie metody [Immunological methods]. Edited by G.Frimelya, translated by A.P. Tarasova. Moscow, 1987. 472 p. (in Russian).

5. Dmitrieva L.N. Obzor epidemiologicheskoy obstanovki po zoonoznym infektsiyam v Privolzhskom federal'nom okruge v 1980–2011 gg. i prognoz ee razvitiya v 2012 g. v sub"ektakh, kuriruemykh RosNIPChI «Mikrob» [Survey of epidemiological situation with zoonogenous infections in Volga federal district for 1980–2011 years and prognosis of its development in 2012 among the subjects supervised by the Russian Health Research Institute for Plague Control «Microbe»]. Available at: http://www.microbe.ru/files/Obzor_zoonoz_PFO.pdf (in Russian).

6. Chibilev A.A., Kliment'ev A.I., Blokhin E.V. Landshaftno-tipologicheskaya karta Orenburgskoy oblasti kak osnova optimizatsii struktury zemel'nogo fonda [Landscape-topology map of Orenburg region as the basis of optimization of the structure of land resources]. Orenburg: Stepi Evrazii, 1997, pp. 152–153 (in Russian).

7. Sherstnev V.M. Osobennosti formirovaniya prirodnykh ochagov GLPS v razlichnykh landshaftnykh provintsiyakh: avtoref. dis. ... kand. med. Nauk [Characteristics of formation of natural foci of Hemorrhagic fever with renal syndrome in different landscape provinces: summary of the thesis ... of Cand. of med. Sciences]. Orenburg, 2005. 24 p. (in Russian).

8. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular

Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, vol. 5, pp. 150–163.

Корнеев Алексей Геннадьевич¹ – кандидат биологических наук, доцент кафедры эпидемиологии и инфекционных болезней ГБОУ ВПО ОрГМА МЗ РФ (тел.: 8 (3532) 56-02-23, e-mail: proletela@mail.ru).

Гаранина Светлана Борисовна² – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (тел.: 8 (8452) 51-52-11, e-mail: svgaranina@mail.ru).

Сергевнин Виктор Иванович³ – доктор медицинских наук, профессор кафедры эпидемиологии с курсом гигиены и эпидемиологии ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ (тел.: 8 (342) 224-61-28, e-mail: viktor-sergevnin@mail.ru).

¹ ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» МЗ РФ, Россия, 60014 г. Оренбург, 460052, ул. Советская, д. 6.

² ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Россия, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46.

³ ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера» МЗ РФ, Россия, 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26.

Korneev Aleksey Gennadyevich¹ – Candidate of Biological Science, associate professor of the department of epidemiology and infectious diseases, Orenburg State Academy of Medicine (tel. 8 (3532) 56-02-23, e-mail: proletela@mail.ru).

Garanina Svetlana Borisovna² – Doctor of Biological Science, leading researcher of the Russian Health Research Institute for Plague Control «Microbe» (tel. 8 (8452) 51-52-11, e-mail: svgaranina@mail.ru).

Sergevnin Viktor Ivanovich³ – Doctor of Medical Science, professor of the department of epidemiology with a course of hygiene and epidemiology of the faculty of advanced doctors` training, Perm State Academy of Medicine named after E.A. Vagner (tel.: 8 (342) 224-61-28, e-mail: viktor-sergevnin@mail.ru).

¹ Orenburg State Academy of Medicine, Russia, 60014, Orenburg, Sovetskaya street, 6.

² Russian Health Research Institute for Plague Control «Microbe», Russia, 410005, Saratov, University street, 46.

³ Perm State Academy of Medicine named after ac. E.A. Vagner, Russia, 614990, Perm, Petropavlovskaya street, 26.