

## АСПЕКТЫ ПРИЛОЖЕНИЯ ОТ-ПЦР ПРИ HANTAAN-, AMUR- И SEOUL-ХАНТАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Кушнарева Т.В.<sup>1,2</sup>, Максема И.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, e-mail: tatyana.kushnareva@inbox.ru;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Владивосток

С помощью метода ОТ-ПЦР изучена динамика циркуляции хантавируса в крови и составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС). Показано, что к началу периода ранней реконвалесценции на фоне снижения частоты выявления вирусной РНК в крови происходит существенное повышение частоты ее обнаружения в составе ЦИК. Впервые специфическая природа ЦИК у больных ГЛПС (из разных очагов на территории Приморского края) выявлялась с помощью метода ОТ-ПЦР. Кроме того впервые РНК хантавируса была выявлена в макрофагах бронхоальвеолярных смывов больных, что подтверждает безусловное участие клеток респираторного тракта в раннем иммунном ответе при ГЛПС и респираторный путь инфицирования человека хантавирусами. Продолжительность обнаружения РНК хантавируса в крови больных ГЛПС, получавших вирозол и верорибавирин, была меньше, чем у больных, не получавших противовирусные препараты. Индикация вирусной РНК продолжительное время в крови больных ГЛПС, ассоциированной с вирусами Amur, Hantaan и Seoul, диктует необходимость применения противовирусных средств в разгар болезни этих больных. Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод ОТ-ПЦР перспективен для ранней диагностики и оценки эффективности этиотропной терапии при ГЛПС.

Ключевые слова: хантавирус, хантавирусные инфекции, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), диагностика, ОТ-ПЦР.

## ASPECTS OF THE APPLICATION OF RT-PCR WITH HANTAAN-, AMUR – AND SEOUL-HANTAVIRAL INFECTIONS

Kushnareva T.V.<sup>1,2</sup>, Maksema I.G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Epidemiology and Microbiology of name G.P. Somova, Vladivostok, e-mail: tatyana.kushnareva@inbox.ru;

<sup>2</sup>Pacific State Medical University, Vladivostok

Using RT-PCR we have studied the dynamics of Hantaviruses circulation in the blood and the composition of circulating immune complexes (CIC) of patients of hemorrhagic fever with a renal syndrome (HFRS). It is shown that by the beginning of the early period of convalescence with the decline in the detection rate of viral RNA in the blood there is a significant increase in the frequency of its detection in CIC. For the first time specific nature of CIC in HFRS patients (from different foci on the territory of PrimorskyKrai) was detected using the method of RT-PCR. In addition, for the first time RNA of Hantaviruses was identified in macrophages of bronchial-alveolar lavages of patients, confirming the unconditional part of the cells of the respiratory tract in early immune response in HFRS and respiratory pathway of human infection with Hantavirus. Length RNA detection of Hantaviruses in the blood of HFRS patients, treated virazole and ribavirin therapy, was less than in patients not treated antiviral medications. Indication of viral RNA for a long time in the blood of HFRS patients associated with Amur, Hantaan or Seoul virus, necessitates the use of antiviral agents in the midst of illness of these patients. The results indicate that RT-PCR is promising for early diagnosis and assessment of the effectiveness of etiologic therapy of HFRS.

Keywords: hantavirus, hantaviral infections, hemorrhagic fever with a renal syndrome (HFRS), diagnosis, RT-PCR.

Юг Дальнего Востока России является эндемичным регионом по геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС), которая широко распространена в Евразии и представляет собой серьезную проблему в связи с тяжестью клинического течения, отсутствием эффективных средств этиотропной терапии и специфической профилактики. По данным молекулярно-биологических исследований [6, 7] этиологическими агентами ГЛПС в очагах сельского эпидемиологического типа в регионе выступают хантавирусы *Amur* и

*Hantaan* (геновариант *FE*), в очаге городского эпидемиологического типа – хантавирус *Seoul* (геновариант *VDV*). Геном хантавирусов представлен отрицательной одноцепочечной РНК, состоит из большого (L), среднего (M) и малого (S) сегментов, которые кодируют вирусную РНК-полимеразу, гликопротеины G<sub>n</sub> и G<sub>s</sub> (ранее G1 и G2) и нуклеокапсидный белок N соответственно [9].

ГЛПС относится к числу трудно диагностируемых заболеваний из-за комплекса клинико-патогенетических синдромов, что влечет несвоевременную госпитализацию, когда исход болезни определяет не вирусемия, требующая этиотропной терапии, а полиорганная недостаточность и развитие неотложных состояний. В настоящее время в России основным методом для подтверждения диагноза ГЛПС при проведении клинико-лабораторных исследований является непрямой метод флюоресцирующих антител (НМФА), который в большинстве случаев позволяет выявлять антитела к хантавирусам с 7 дня от начала заболевания. Исключение составляют больные с поздней выработкой антител, концентрации которых не достаточно для выявления в НМФА, а также серонегативные случаи, число которых, по оценкам некоторых авторов, колеблется от 1,2 % до 5,0 %. Вирусологические методы исследования не используются для ранней постановки диагноза ГЛПС, поскольку хантавирусы относительно медленно размножаются в культуре клеток.

Применение молекулярно-биологических методов исследования – одно из новых направлений в изучении хантавирусов и вызываемых ими инфекций [2]. Реакция обратной транскрипции с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) – высокочувствительный метод, в котором в качестве исходной матрицы используется к ДНК, полученная методом обратной транскрипции отрицательно заряженной РНК хантавируса. Высокая чувствительность определяет значимую роль ОТ-ПЦР в ранней диагностике хантавирусных инфекций.

ПЦР широко используется при изучении патогенеза многих вирусных инфекций и эффективности использования противовирусных средств. В настоящее время этиотропная терапия вирусных заболеваний приобретает все большую значимость. В терапии острых и хронических рецидивирующих инфекций используется обладающий широким спектром активности против РНК- и ДНК-содержащих вирусов препарат рибавирин. Однако клиническая эффективность рибавирина была подтверждена только при назначении его в начальном периоде болезни. В России этиотропная терапия у больных ГЛПС не получила распространения, что можно объяснить мнением о коротком периоде вирусемии при ГЛПС, а также поздним сроком госпитализации большей части пациентов с тяжелыми формами инфекции, когда уже не наблюдается быстрого прерывания репликации хантавирусов противовирусными средствами.

Цель работы – провести анализ эффективности применения метода ОТ-ПЦР при ранней диагностике хантавирусных инфекций, обусловленных вирусами *Hantaan*, *Amur* и *Seoul*, по данным выявления РНК хантавируса у больных ГЛПС в сыворотках крови, циркулирующих иммунных комплексах и макрофагах бронхоальвеолярного лаважа, а также при оценке эффективности этиотропной терапии.

### **Материалы и методы**

Клиническим материалом для исследования служили пробы крови (n=97) от больных ГЛПС, заразившихся в очагах сельского и городского эпидемиологического типов на территории Приморского края и находившихся на лечении в инфекционных отделениях больниц г. Владивостока. Пробы крови хранились до лабораторного исследования при температуре – 25<sup>0</sup>С. Специфические антитела в сыворотках крови больных ГЛПС выявляли в НМФА по общепринятой методике. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) проводили с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) м.м. 6000. При этом 10 % раствор ПЭГ, приготовленный на 0,1 М боратном буферном растворе рН 8,4, доводили до конечной концентрации 4 %. Бронхоальвеолярный лаваж был проведен у шести пациентов, находившихся на стационарном лечении в инфекционном отделении, на 7–10 день от начала заболевания. Полученный бронхоальвеолярный смыв (БАС) хранили в замороженном состоянии.

Оценку эффективности применения препаратов рибавирина (вирозол – инфузионная форма и верорибавирин – пероральная форма), которые были включены в комплекс традиционной патогенетической терапии, проводили у 20 больных с тяжелым течением ГЛПС, ассоциированной с вирусами *Hantaan*, *Amur* и *Seoul*. В качестве контроля были взяты сопоставимые по возрасту, полу и тяжести пациенты (n = 20) без включения противовирусных средств в традиционную терапию. Начало лечения у всех больных приходилось на 4–5 день от начала заболевания. В течение болезни обозначены следующие периоды: лихорадочный (1–7 день), олигурический (8–14 день), полиурический (15–21 день) и реконвалесценции (с 22 дня от начала болезни) [3].

Выделение общей РНК проводили стандартным методом комплектами реагентов «ВектоРНК-экстракция» (ЗАО «Вектор-Бест»), «РИБО-сорб» и «РИБО-золь-С» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Синтез к ДНК и амплификацию фрагментов к ДНК проводили методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров и условий тест-системы «Векто-Ханта-РНК-ампли» (участок S-сегмента, группоспецифичного к хантавирусам *Hantaan*, *Amur* и *Seoul*) и набором реагентов «АмплиСенс<sup>®</sup>Hantavirus» (*Hantavirus* комплекса ГЛПС), согласно инструкции производителей. Визуальную индикацию полученных ПЦР-

продуктов осуществляли методом гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле в присутствии бромида этидия.

### Результаты и обсуждение

Нами проанализировано несколько значимых в диагностике и лечении ГЛПС аспектов приложения ОТ-ПЦР (табл. 1).

**Таблица 1**

Изучаемые аспекты приложения ОТ-ПЦР при ГЛПС

Аспект приложения	Характеристика
Время	Проведение ранней диагностика по обнаружению РНК хантавируса в сыворотках крови больных
Иммунные комплексы	Установление специфической природы циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), участвующих в нейтрализации и элиминации вируса
Клетки-мишени	Обнаружение РНК хантавируса в макрофагах бронхоальвеолярных смывов (БАС) у больных
Этиотропная терапия	Контроль эффективности лечения противовирусными средствами

Ранняя постановка лабораторного диагноза при ГЛПС, вызываемой разными серотипами хантавирусов, имеет большое значение при выборе правильной тактики ведения и лечения больных. Сыворотки крови от больных ГЛПС с разной тяжестью течения болезни (n = 51) были исследованы с помощью ОТ-ПЦР в динамике заболевания. Частота выявления РНК хантавируса в крови больных изменялась по ходу болезни и достоверно снижалась к периоду ранней реконвалесценции. Так, частота обнаружения РНК хантавируса в крови больных с тяжелым и среднетяжелым течением инфекции в олигурический период была примерно одинаковой (около 63 %), снижаясь в полиурический период до 13 %. Специфическую РНК обнаруживали до 18–20 дня от начала заболевания.

Метод ОТ-ПЦР был применен нами для установления специфической природы ЦИК у больных ГЛПС. Специфические ЦИК выявлялись при разном течении инфекции. Отмечено, что при тяжелой форме болезни частота выявления РНК хантавируса в составе ЦИК была выше, чем у больных со среднетяжелой формой заболевания. Следующим явилось изучение динамики выявления РНК хантавируса в составе ЦИК. Специфические антитела в сыворотках крови больных ГЛПС регистрировались с 5–6 дня заболевания, достигали максимальных значений к третьей неделе с дальнейшим выходом на плато. В этой же обследуемой группе больных уровень ЦИК соответствовал уровню антителообразования в каждом периоде болезни, при этом параллельно изменялась динамика частоты присутствия специфической РНК в составе ЦИК. До 10 дня заболевания РНК хантавируса в составе иммунных комплексов (n=28) была обнаружена в 6 образцах сывороток (21,4 %), а с 11 по 21 день – в 16 образцах (57,1 %). В сыворотках крови поздних реконвалесцентов ГЛПС (n =

22), взятых в период от 1,5 месяцев до 2-х лет от начала заболевания и не имевших отклонения биохимических показателей от нормы, в шести случаях были выявлены неспецифические ЦИК, в составе которых не обнаружена геномная РНК хантавируса.

При исследовании в ОТ-ПЦР образцов бронхоальвеолярных смывов РНК хантавируса была обнаружена у трех из пяти пациентов со среднетяжелым течением инфекции в олигоурический период (с 8 по 11 день от начала заболевания). У одного больного вирусная РНК в макрофагах БАС была обнаружена на 20 день болезни, когда положительные находки в сыворотках крови очень редки.

Эффективность лечения противовирусными средствами оценивалась при сравнении динамики элиминации РНК хантавируса из крови двух групп больных ГЛПС с тяжелой формой заболевания – контрольная (получали комплексную традиционную патогенетическую терапию) и опытная (с дополнительным включением препаратов рибавирина). Кровь у пациентов обеих групп забиралась с 3–4 дня по 23–24 день от начала заболевания. Перед началом этиотропной терапии РНК хантавируса была выявлена у пациентов обеих групп (табл. 2).

**Таблица 2**

Оценка эффективности противовирусной терапии в лечении больных с тяжелой формой ГЛПС по данным обнаружения РНК хантавируса в ОТ-ПЦР

Больные ГЛПС, получавшие традиционную патогенетическую терапию	Положительные находки РНК хантавируса в сыворотках крови (абс.) день лечения (день болезни)							
	0 (4-5)	1-2 (5-6)	3-4 (7-8)	5-6 (9-10)	7-8 (11-12)	9-10 (13-14)	11-12 (15-16)	13-14 (17-18)
Все обследуемые: <i>опытная</i> и <i>контрольная</i> группы (n=40)	40	29	15	13	6	2	0	0
<i>ОПЫТНАЯ</i> Препараты рибавирина включены в лечение (n=20)	20	12	3	2	0	0	0	0
<i>КОНТРОЛЬНАЯ</i> Противовирусные средства не включены (n=20)	20	17	12	11	6	2	0	0

Продолжительность обнаружения РНК хантавируса и количество положительных РНК-проб в ходе лечения виразолом и рибавирином были меньше, чем без применения противовирусных средств. Так, РНК хантавируса через 1–2 дня после введения виразола обнаруживалась у 60 % и 85 % больных из опытной и контрольной групп соответственно (табл. 2). В среднем специфическая РНК у пациентов из опытной группы не обнаруживалась в крови уже через 3–4 дня после введения виразола, в то время как в контрольной группе

положительные РНК-пробы выявлялись до 12–14 дня заболевания. Кроме того, более выраженная вирусемия в контрольной группе коррелировала с более высоким содержанием в крови специфических ЦИК, имеющих патогенетическое значение при ГЛПС.

В работе Морозова В.Г с соавт. [4] при использовании в ПЦР-амплификации стандартного «гнездового» набора праймеров к М-сегменту РНК хантавируса была выявлена у 42,7 % обследованных больных ГЛПС, с присутствием в крови до 15 дня болезни. В наших исследованиях с помощью амплификационной тест-системы «Вектор-Бест» с двумя парами праймеров к S-сегменту, кодирующему белок N и отличающемуся высокой консервативностью среди хантавирусов, в олигурический период РНК хантавируса была выявлена у 63 % больных ГЛПС, с присутствием в 13% случаях до конца полиурического периода. На примере вируса *Hantaan* китайскими исследователями [8] при детекции вирусной РНК в крови больных ГЛПС была показана большая эффективность праймеров к S-гену, по сравнению с праймерами к М-гену.

Б.З. Сиротин [5] представил доказательства, отрицающие роль иммунокомплексных механизмов в формировании органной патологии при ГЛПС, считая при этом ЦИК как нейтрализующие, способствующие элиминации возбудителя из организма больного. Наши данные согласуются с этим мнением: в составе ЦИК мы выявляли РНК хантавируса в начальный период болезни в 2,7 раза реже, чем к концу третьей недели заболевания, что может свидетельствовать о том, что индукция ЦИК при ГЛПС носит скорее защитный, чем повреждающий характер. Ранее специфическая природа ЦИК у больных ГЛПС была подтверждена с помощью прямого иммуноферментного анализа в условиях избытка антигена [1]. Мы применили более чувствительный ПЦР-анализ, позволяющий исследовать широкий спектр иммунных комплексов, независимо от их физико-химических свойств.

Детекция РНК хантавируса в макрофагах бронхоальвеолярных смывов у больных ГЛПС продемонстрировала возможность применения ОТ-ПЦР в качестве дополнительного метода при диагностике ранних и серонегативных форм заболевания, когда использование серологических тестов не эффективно. Кроме того, наличие специфической РНК в макрофагах БАС подтверждает респираторный путь инфицирования человека хантавирусом и безусловное участие клеток респираторного тракта в раннем иммунном ответе при ГЛПС.

Назначение рибавирина у больных ГЛПС, обусловленной хантавирусами *Puumala* (в России), *Hantaan* (в Китае) и *SinNombro* (в США), по данным отечественных и зарубежных исследователей, оказалось эффективным в ранние сроки заболевания, вызывая быстрое снижение вирусной нагрузки и прекращение репликации вируса. Наши исследования подтверждают эти данные и свидетельствуют об эффективности применения рибавирина при тяжелом течении *Hantaan*-, *Amur*- и *Seoul*-вирусной инфекций по вирусологическому

показателю (быстрое снижение вирусемии в крови пациентов опытной группы). Применение молекулярно-генетических методов исследования позволило установить продолжительное присутствие РНК хантавируса в крови больных от начала болезни, что диктует необходимость применения противовирусных препаратов в разгар заболевания и контроля их эффективности при лечении ГЛПС, вызванной разными серотипами хантавирусов.

### **Заключение**

Получены новые данные о возможности использования ОТ-ПЦР при исследовании макрофагов бронхоальвеолярного лаважа для уточнения диагноза ГЛПС в сомнительных случаях, раннего выявления вирусемии в сыворотках крови, специфичности циркулирующих иммунных комплексов, а также оценки элиминации вирусной РНК при применении противовирусных средств у больных с *Hantaan*-, *Amur*- и *Seoul*-вирусной инфекциями. Таким образом, метод ОТ-ПЦР перспективен в плане ранней диагностики и оценки эффективности этиотропной терапии у больных ГЛПС, обусловленной разными серотипами хантавирусов.

### **Список литературы**

1. Гавриловская И. Н., Подгороденко В. Н., Апекина Н. С. и соавт. Определение специфических иммунных комплексов и динамика их циркуляции у больных ГЛПС // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1987. – Т. 49. – № 4. – С. 71-76.  
Gavrilovskaya I. N., Podgorodenko V. N., Apekina N. S. et al. Zh. Mikrobiol., epidemiol., immunol. 1987. Vol. 49. No. 4. P. 71-76.
2. Гаранина С. Б., Журавлев В. И., Шипулин Г. А. и соавт. Перспективы использования молекулярно-генетических методов для ранней диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом и оценки эпизоотической активности природных очагов хантавирусов // Эпидемиол. и инфекц. болезни. – 2005. – № 6. – С. 37-41.  
Garanina S. B., Zhuravlev V. I., Shipulin G. A. et al. Zh. Epidemiol. and Infect. Diseases. 2005. No. 6. P. 37-41.
3. Иванис В. А. Иммунопатогенез, клиника, иммунокорректирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в регионе циркуляции разных серотипов хантавирусов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Владивосток, 2004. – 52 с.  
Ivanis V. A.: Aftoref. dis. ... doct. med. nauk. Vladivostok, 2004. 52 p.
4. Морозов В. Г., Морзунов С. П., Хайбуллина С. Ф. и соавт. Генетическая идентификация хантавирусов в крови больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2004. – № 2. – С. 43-47.

Morozov V. G., Morzunov S. P., Hajbullina S. F. et al. Zh. Epidemiol. and Infect. Diseases. 2004. No. 2. P. 43-47.

5. Сиротин Б. З. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. Хабаровск, 1994. – 302 с.

Sirotin B. Z. Hemorrhagic fever with a renal syndrome. Habarovsk, 1994. 302 p.

6. Слонова Р. А., Кушнарева Т. В., Компанец Г. Г. Хантавирусная инфекция в Приморском крае – эпидемиологическая ситуация в очагах циркуляции разных серотипов вируса // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2006. – № 3. – С. 74-77.

Slonova R. A., Kushnareva T. V., Kompanets G. G. Zh. Mikrobiol., epidemiol., immunol. 2006. No. 3. P. 74-77.

7. Яшина Л. Н. Генетическая характеристика хантавирусов, циркулирующих в Приморском крае // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2006. – № 3. – С. 78-80.

Yashina L. N. Zh. Mikrobiol., epidemiol., immunol. 2006. No. 3. P. 78-80.

8. Pan Lei, Huang Chang-xing, Li Guang-yu et al. Detecting hantavirus RNA from patients sera by RT-PCR and sequence analysis. Hemorrhagic fever with renal syndrome [HFRS], In Book: Hantavirus pulmonary syndrome [HPS], and Hantaviruses. Annecy, France, 2001, p. 211.

9. Schmaljohn C. S., Hjelle B. Hantaviruses: A global disease problem // Emerg. Infect. Dis. –1997. – Vol. 3, No. 2. – P. 95-104.

#### **Рецензенты:**

Коршукова О.А., д.м.н., профессор, руководитель научного отдела ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владивосток;

Зайцева Е.А., д.м.н., профессор кафедры микробиологии и вирусологии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владивосток.