

УДК 578.833.29:578.53(571.63)

Г.Г. Компанец

НИИ микробиологии и эпидемиологии СО РАМН (г. Владивосток)

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХАНТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ*Ключевые слова: хантавирус, генотип, вирулентность.*

Изучена вирулентность штаммов хантавирусов двух геновариантов — *Far East* вируса *Hantaan* и *Vladivostok* вируса *Seoul*, выделенных от диких мышевидных грызунов и больных людей из очагов двух эпидемиологических типов Приморского края. Показано, что штаммы геноварианта *Far East*, несмотря на их происхождение, обладают высокой вирулентностью для новорожденных белых мышей, но различаются по вирулентности для новорожденных белых крыс. Штаммы геноварианта *Vladivostok*, выделенные от больных людей, авирулентны для исследованных животных. Региональные штаммы отличались по своим биологическим свойствам от высоковирулентных штаммов 76-118 вируса *Hantaan* и SR-11 вируса *Seoul*, что может быть связано с различиями на уровне их генома.

К настоящему времени род *Hantavirus* семейства *Bunyaviridae* включает более 30 генотипов/серотипов хантавирусов, из которых 5 вызывают патологию у человека в странах Евразии [11]. Несмотря на то, что клиническая картина геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), ассоциированной с разными серотипами хантавируса, демонстрирует сходство основных симптомов, показана связь между серотипом вируса, тяжестью клинических проявлений инфекции и выраженностью отдельных синдромов. Известно, что вирусы *Hantaan*, *Dobrava* и *Amur* вызывают тяжелое клиническое течение ГЛПС, нередко с летальным исходом, что свидетельствует о высокой вирулентности этой группы возбудителей для человека. Напротив, случаи заболевания, связанные с вирусами *Seoul* и *Puumala*, протекают более благоприятно и редко приводят к летальному исходу. Многочисленные генетические исследования свидетельствуют о существовании внутри отдельных генотипов группы генетически сходных субтипов или геновариантов. Для вируса *Puumala* показано наличие по крайней мере 7 отдельных географических геновариантов [13]. Анализ изолятов от полевой мыши и серой крысы, выделенных в провинции Шандунь (восточный Китай), показал существование в очагах ГЛПС трех субтипов вируса *Hantaan* и двух субтипов вируса *Seoul* [9], а в провинции Ляонин (северо-восточный Китай) выявлено семь генетических подтипов вируса *Seoul* [12]. Предполагается, что различия на уровне генома в рамках одного генотипа могут отражаться на различиях в вирулентности штаммов хантавирусов, в том числе и для человека. Так, по мнению В.Г. Морозова [1], более тяжелое течение *Ришта*-инфекции на европейской территории России по сравнению со скандинавскими странами связано с генетическими различиями между штаммами вируса, циркулирующими на разных территориях. В. Klempa et al. (2008) предположили, что

различия геновариантов вируса *Dobrava* DOBV-Aa, выделенного от полевой мыши, и DOBV-Ар — от кавказской лесной мыши в европейской части России, обуславливают различия в тяжести течения ГЛПС: тяжелое — для DOBV-Ар и легкое — для DOBV-Aa [6].

На территории Приморского края в популяциях диких мышевидных грызунов циркулируют генетические варианты *Far East* вируса *Hantaan*, *Vladivostok* вируса *Seoul*, а также вирусы *Amur*, *Khabarovsk* и *Puumala*, из которых первые три являются возбудителями заболевания у людей [2, 14]. При генетическом анализе фрагмента М-сегмента (нуклеотиды 2735–2993) региональных штаммов геноварианта *Far East* различия нуклеотидных последовательностей с прототипным штаммом 76-112 вируса *Hantaan* составили 9,8–12,0%, различия на уровне аминокислотных последовательностей варьировали от 0 до 3% [3]. Штаммы генетического варианта *Vladivostok* вируса *Seoul* имели отличия нуклеотидных последовательностей от прототипного штамма 80-39 на 2,4–5,1%. Различия аминокислотных последовательностей здесь были минимальными, однако выявлена одна уникальная аминокислотная замена — Ile262 на Thr262, — отличающая местные штаммы от штаммов вируса *Seoul*, изолированных в других странах. Для генотипа *Puumala* в очагах Приморского края выявлен геновариант *Shkotovo*, его различия с другими штаммами вируса *Puumala* составили 18,6–23,7% на уровне нуклеотидных и 3,7–10% — на уровне аминокислотных последовательностей.

Генетическое разнообразие, отмечающееся внутри отдельных генотипов хантавируса, возможно, отражается и на их биологических свойствах, в частности — на вирулентности для лабораторных животных. Однако это вопрос к настоящему времени оставался практически не изученным, а среди хантавирусов, циркулирующих в популяциях мышей рода *Apodemus*, наиболее изучены вирулентные свойства прототипного штамма 76-118 вируса *Hantaan* [5, 8].

Цель настоящей работы состояла в установлении влияния генетических особенностей штаммов геновариантов *Far East* вируса *Hantaan* и *Vladivostok* вируса *Seoul*, выделенных в очагах Приморского края, на их вирулентные свойства для новорожденных лабораторных животных.

В эксперименте использовали 7 штаммов хантавирусов геноварианта *Far East*, выделенных на культуре клеток Vero E6 в разные годы от полевых мышей, отловленных в Спасском районе Приморского края: ПМ-85, ПМ-89, ПМ-95, а также штаммы Щ-4605,

Таблица

Вирулентность различных штаммов хантавирусов для новорожденных лабораторных животных

Хантавирус		Белые мыши		Белые крысы		Сирийские хомячки	
Штамм	Источник выделения	Летальность, %	СПЖ ¹ , дни	Летальность, %	СПЖ ¹ , дни	Летальность, %	СПЖ ¹ , дни
76-118 вируса <i>Hantaan</i>	<i>A. agrarius</i>	100,0	20,0	66,7	23,3	44,4	21,0
Геновариант <i>Far East</i> вируса <i>Hantaan</i>							
ПМ-85	<i>A. agrarius</i>	100,0	19,3	100,0	18,0	60,0	21,0
ПМ-89	<i>A. agrarius</i>	100,0	17,0	62,9	17,3	н.и. ⁴	
ПМ-95	<i>A. agrarius</i>	100,0 (60,6 ²)	17,2 (21,0 ²)	0,0	2 ³	н.и.	
Щ-4605	Больной человек	100,0	19,0 (21,0 ²)	44,3	18,2	н.и.	
3-4642	Больной человек	100,0	20,0	50,6	19,0	н.и.	
Д-7406	Больной человек	100,0	21,0	н.и.		н.и.	
К-7227	Больной человек	100,0	19,0 (24,0 ²)	н.и.		н.и.	
SR-11 вируса <i>Seoul</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	83,3	20,1	100	18,5	н.и	
Геновариант <i>Vladivostok</i> вируса <i>Seoul</i>							
Н-7105	Больной человек	0,0	52,0	0,0	52,0	н.и.	
В-7326	Больной человек	0,0	52,0	0,0	52,0	н.и.	
Ш-9320	Больной человек	0,0	52,0	0,0	52,0	н.и.	
М-9303	Больной человек	0,0	52,0	0,0	52,0	н.и.	
П-725	Больной человек	0,0	52,0	0,0	52,0	н.и.	

¹ Средняя продолжительность жизни.² При внутрибрюшном заражении.³ При наличии клинических симптомов гибели животных не отмечали до 52-го дня (срок наблюдения).⁴ Не исследовали.

3-4642, Д-7406 и К-7227, выделенные от больных ГЛПС из трех районов края, и 5 штаммов геноварианта *Vladivostok* вируса *Seoul* (Н-7105, В-7326, Ш-9320, М-9303, П-725), выделенные от больных в городском очаге ГЛПС. Среди взятых в исследование генетически подтверждены как геновариант *Far East* штаммы ПМ-85, ПМ-89, ПМ-95, 3-4642, Д-7406 и К-7227, как геновариант *Vladivostok* — штаммы В-7326, М-9303 и П-725. Для сравнения использовали прототипный штамм 76-118 вируса *Hantaan*, выделенный от полевой мыши (Ю. Корея), и штамм SR-11 вируса *Seoul*, выделенный от лабораторной белой крысы (Япония). Взятые в исследование штаммы прошли на культуре клеток различное количество пассажей (например, от 5—8 пассажей для штамма П-725, 14—21 пассажа — для штамма 3-4642, 5—16 пассажей — для штамма М-9303, до 5—32 пассажей — для штамма ПМ-85 и 18—41 пассаж — для штамма 76-118 вируса *Hantaan*).

Лабораторных животных (617 беспородных белых мышей, белых крыс и сирийских хомячков) в возрасте 12—24 часов после рождения заражали в мозг в дозе 0,01 мл (для мышей), 0,03 мл (для крыс и хомячков) или внутрибрюшинно в дозе 0,03 мл (для мышей) и 0,05 мл (для крыс и хомячков) вирусосодержащей жидкостью с исходным титром не менее 4,0 lg фокусформирующих единиц на 1,0 мл. После заражения состояние животных оценивали дважды в день. После развития характерной клинической симптоматики и гибели животных, брали образцы органов (почки, печень, легкие, селезенка, сердце, мозг) для выявления специфического антигена и образцы крови

на наличие специфических антител. При отсутствии клинических симптомов животных умерщвляли передозировкой наркоза и проводили взятие образцов органов и крови на 35—40-й день после заражения. Опыты по выявлению вирулентных свойств штаммов для лабораторных животных проводили трехкратно.

Уход за инфицированными животными и работу с ними осуществляли в условиях вивария с уровнем безопасности Р-3 (BSL-3) и с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (1977).

Специфический антиген в 10% суспензиях органов грызунов выявляли в иммуноферментном анализе с помощью коммерческих наборов «Хантагност», производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН (Москва), согласно инструкции производителя. Наличие специфических антител в сыворотке крови определяли с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител.

В серии экспериментов было установлено, что несмотря на длительное пассирование на культуре клеток, прототипный штамм 76-118 вируса *Hantaan* обладал высокой вирулентностью для новорожденных белых мышей, вызывая у них на 17—18-й день симптомы, характерные для экспериментальной хантавирусной инфекции (повышенная возбудимость, взъерошенность шерсти, потеря в массе, судороги, тремор, атаксия), и гибель через 24—48 часов после появления первых признаков заболевания. Средняя продолжительность жизни животных составляла в среднем 20 дней (табл.).

При заражении в мозг 33-суточных белых крыс летальность составила 66,7%, а гибель в среднем наступала в срок 23,3 дня. При внутримозговом заражении 9 новорожденных сирийских хомяков штаммом 76-118 гибель в 44,4% случаев зарегистрирована на 21-й день после заражения.

Региональные штаммы геноварианта *Far East* ПМ-85, ПМ-89 и ПМ-95, выделенные от полевой мыши, так же как и прототипный штамм, обладали высокой вирулентностью для новорожденных белых мышей. При заражении в мозг 197 животных первые признаки заболевания, сходные с симптомами при заражении штаммом 76-118, появлялись на 15–16-й день в 100% случаев, а к 18–20-му дню отмечали гибель животных с симптомами паралича задних конечностей. При внутрибрюшинном заражении штаммом ПМ-95 новорожденных белых мышей летальность была ниже (60,6%). При заражении мышей штаммами геноварианта *Far East* вируса *Hantaan*, изолированными от больных ГЛПС, летальность также составила 100% примерно в те же сроки, как и при заражении штаммами, выделенными от полевой мыши. При внутримозговом заражении гибель животных в среднем отмечена в срок 19,7 дня, при внутрибрюшинном — в 21 день.

При заражении белых крыс штаммами ПМ-85, ПМ-89 и ПМ-95 генотипа *Far East* летальный исход отмечен у 31,9% животных. Характерно, что при заражении штаммом ПМ-85 гибель регистрировалась в 100% случаев, а штаммом ПМ-89 — в 62,9%. При заражении крыс штаммами Щ-4605, 3-4642 геноварианта *Far East*, выделенными от больных ГЛПС, летальность составила 44,3 и 50,6% соответственно. Исключение составил штамм ПМ-95, который не вызывал гибели новорожденных белых крыс, хотя у них отмечались признаки хантавирусной инфекции (повышенная возбудимость, судороги, нарушение координации), но не регистрировались снижение веса и взъерошенность шерсти. Животные с такими симптомами визуально хорошо набирали в росте и весе, оставались живыми до 52-го дня после заражения (срок наблюдения).

В опытах на новорожденных сирийских хомячках был изучен штамм ПМ-85. У животных, зараженных в мозг, развивалась типичная клиническая симптоматика, с последующей гибелью в 60% наблюдений.

Таким образом, исследования показали, что штаммы геноварианта *Far East*, выделенные как от полевой мыши, так и от больных ГЛПС, не отличались от прототипного штамма 76-118 вируса *Hantaan* по вирулентности для новорожденных белых мышей, но различались по вирулентности для новорожденных белых крыс и сирийских хомячков.

В исследованиях, проведенных с использованием штаммов геноварианта *Vladivostok* вируса *Seoul*, изолированных от больных ГЛПС (Н-7105, В-7326, Ш-9320, М-9303, П-725), показано, что заражение этими штаммами не вызывало у новорожденных лабораторных крыс и мышей манифестной инфекции

и гибели. В то же время штамм SR-11 вируса *Seoul* при внутримозговом и внутрибрюшинном заражении вызывал клинические проявления инфекции и гибель 100% новорожденных белых крыс и 83,3% новорожденных белых мышей при заражении в мозг.

Необходимо отметить, что при заражении штаммами геновариантов *Far East* и *Vladivostok* у всех животных с симптомами инфекции антиген хантавируса определяли чаще в легких, мозге и почках, а также выявляли специфические антитела в титре 1:16–1:128. У части крыс, зараженных штаммами 76-118 и ПМ-89, у которых клинических симптомов не наблюдалось, на 35-й день после заражения антиген хантавируса был выявлен в легких, мозге или почках на фоне высокого титра (1:64–1:512) специфических антител. У крыс, зараженных штаммом ПМ-95, с явными клиническими проявлениями хантавирусной инфекции, не приводящей к гибели, специфический антиген обнаружен во многих органах (почки, селезенка, печень, мозг, легкие), на фоне высоких показателей титра специфических антител (1:32–1:1024) высокой avidности.

Установлено, что число пассажей на культуре клеток Vero E6 штаммов, выделенных от полевой мыши, и прототипного штамма 76-118 вируса *Hantaan* не отражалось на их вирулентности для модели новорожденных мышей. В то же время при заражении новорожденных крыс штаммом 76-118 летальность у животных снижалась после 18, 32 и 38 пассажей на культуре клеток и составила соответственно 100, 62,7 и 60% ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о высокой вирулентности для новорожденных белых мышей всех исследованных штаммов геноварианта *Far East*, выделенных от *Apodemus agrarius* и больных ГЛПС в Приморском крае. В то же время отмечены отличия по вирулентности для новорожденных белых крыс: высокая — для штамма ПМ-85, умеренная — для штаммов 76-118, ПМ-89, Щ-4605, 3-4642 и низкая (без гибели животных) — для штамма ПМ-95.

Различия в вирулентности штаммов геноварианта *Far East* и прототипного штамма 76-118 вируса *Hantaan* для новорожденных белых крыс и сирийских хомячков могут быть обусловлены разной чувствительностью к ним лабораторных животных. Менее выраженная вирулентность штамма ПМ-95 для белых крыс пока не находит объяснения и, возможно, отражает фенотипические свойства, связанные с изменениями в генотипе этого штамма.

Не исключено, что авирулентность, выявленная в группе штаммов геноварианта *Vladivostok* вируса *Seoul*, выделенных от больных ГЛПС в городском очаге, для лабораторных животных может быть связана с уникальной для этих штаммов заменой в аминокислотной последовательности гликопротеина G2 в позиции 262, которая отсутствует у штамма SR-11. Как показано, даже одна замена в аминокислотной последовательности этого белка приводила к потере вирулентности штамма 76-118 для новорожденных белых мышей [4].

Адаптация различных вирусов на культуре клеток нередко сопровождается мутациями на геномном уровне. При хантавирусной инфекции A. Lundkvist et al. (1997) показали, что адаптация штамма *Kazan-wt* вируса *Puumala* к культуре клеток Vero E6 приводила к потере инфекционности данного штамма для его природного носителя — рыжей полевки, что было связано с появлением мутаций в некодирующем регионе S-сегмента вируса в позициях 26, 1577, 1580 [10]. Таким образом, длительное культивирование хантавирусов на культуре клеток в наших опытах, возможно, привело к изменению их генотипических и фенотипических свойств, в частности к снижению вирулентности для новорожденных белых крыс. Однако для более точного вывода о природе этого феномена необходимо в дальнейшем генетическое подтверждение.

В настоящее время установлено, что штамм 76-118 вируса *Hantaan* обладает высокой вирулентностью для новорожденных (до 7-го дня жизни) линейных и беспородных лабораторных мышей, но менее вирулентен для новорожденных белых крыс, тогда как штаммы вируса *Seoul*, выделенные от лабораторной крысы (SR-11, B-1), обладают высокой вирулентностью для новорожденных крыс, по сравнению с белыми мышами того же возраста [5, 8]. Н.К. Zhang et al. (1989) показали, что штамм SR-11 вируса *Seoul*, вызвавший у персонала вивария, где содержались зараженные животные, случаи заболевания ГЛПС, обладал высокой вирулентностью для новорожденных белых крыс линии Wistar. В то же время штамм K1-262, выделенный от серой крысы, отловленной в неэндемичном по ГЛПС районе Японии, оказался авирулентным для этих животных [15]. Заражение вирусом *Dobrava* вызывало у новорожденных мышей летальную инфекцию, тогда как отличающийся от него на уровне аминокислотных последовательностей на 6% вирус *Saarema* (DOB-Aa), был авирулентен при использовании этой модели [7]. Однако сравнительные исследования, связывающие генетическую гетерогенность циркулирующих штаммов разных хантавирусов и их биологические свойства, пока ограничены.

Несмотря на генетические различия в структуре М-сегмента региональных ^ди?дди-подобных штаммов, выделенных в разные годы от полевой мыши и из сгустков крови больных ГЛПС, от прототипного штамма 76-118 вируса Хантаан, разницы по вирулентности для новорожденных белых мышей у исследованных штаммов не выявлено. Сохранение высокой вирулентности штаммов геноварианта *Far East* для мышей при длительном пассировании на культуре клеток, по всей видимости, является генетически детерминированным признаком. Интересным, на наш взгляд, является факт снижения вирулентности для новорожденных белых крыс штаммов &ом/-подобного геноварианта *Vladivostok*, которые отличаются от штамма SR-11 одной аминокислотной заменой.

Таким образом, выявленные на территории Приморского края географические геноварианты хан-

тавирусов имеют не только сходство, но и существенные различия в вирулентности с прототипными штаммами известных генотипов.

Литература

1. Морозов В. Г. Клинико-эпидемиологическая характеристика, специфическая диагностика и лечение различных вариантов геморрагической лихорадки с почечным синдромом: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - СПб., 2002.
2. Слонова Р. А., Компанец Г. Г., Подогова Л. М. и др. // *Вопр. вирусол.* - 1999. - № 5. - С. 213-217.
3. Яшина Л. Н. // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* - 2006. - № 3. - С. 78-81.
4. Isegawa Y., Tanishita O., Ueda S., Yamanishi K. // *J. Gen. Virol.* - 1994. - Vol. 75. - P. 3273-3278.
5. Kim G., McKee J. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* - 1985. - Vol. 34. - P. 388-395.
6. Klempa B., Tkachenko E. A., Dzagurova T. K. et al. // *Emerg. Infect. Dis.* - 2008. - Vol. 14, No. 4. - P. 617-625.
7. Klingstrom J., Hardestam J., Lundkvist A. // *Microbes Infect.* - 2006. - Vol. 8, No. 3. - P. 728-737.
8. Lee H. W., Lee P. W., Na B. M., Baek L. J. // *J. Kor. Soc. Virol.* - 1990. - Vol. 20. - P. 159-167.
9. Li J., Zhao Z., Wang Z. et al. // *Chin. Med. J.* - 2007. - Vol. 120, No. 9. - P. 825-830.
10. Lundkvist A., Cheng Y., Sjolander K. B. et al. // *J. Virol.* - 1997. - Vol. 71, No. 12. - P. 9515-9523.
11. Muranyi W., Bahr U., Zeier M., vander Woude F. J. // *J. Am. Soc. Nephrol.* - 2005. - Vol. 16. - P. 3669-3679.
12. Qu Y. G., Yang G. Q., Zou Y. et al. // *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* - 2006. - Vol. 27, No. 6. - P. 513-517.
13. Sironen T., Vaheri A., Plyusnin A. // *J. Virol.* - 2001. - Vol. 75, No. 23. - P. 11803-11810.
14. Yashina L., Patrushev N., Ivanov L. et al. // *Arch. Virol.* - 2000. - Vol. 70, iss. 1-2. - P. 31-44.
15. Zhang X. K., Takashima I., Mori F., Hashimoto N. // *Microbiol. Immunol.* - 1989. - Vol. 33, No. 3. - P. 195-205.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE HANTAVIRUS, CIRCULATING IN PRIMORSKI KRAI

G. G. Kompanets

Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok)

Summary — The viral activity of the strains of hantavirus infection of two gene variants — *Far East virus Hantaan* and *Vladivostok virus Seoul*, allocated from wild mice rodents and sick people from the centers of two epidemiological types of Primorsky Krai is investigated. It is shown, that gene variant strains *Far East*, despite of their origin, possess the high viral activity for newborn white mice, but differ on viral activity for newborn white rats. Gene variant *Vladivostok*, allocated from sick people, aviral for the investigated animals. Regional strains differed on the biological properties from high viral strains of 76 118 virus *Hantaan* and SR1 1 virus *Seoul* that can be connected to distinctions at their genome level.

Keywords: hantavirus infection, genotype, viral activity.