

ISSN 1609-1175

Тихоокеанский Медицинский Журнал

PACIFIC MEDICAL JOURNAL

2008, № 2

РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1997 году
Выходит один раз в три месяца

ХАНТАВИРУСЫ И ХАНТАВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ
к 75-летию изучения геморрагической лихорадки с почечным синдромом
на Дальнем Востоке России



Издательство
МЕДИЦИНА ДВ

Главный редактор В.Б. Шуматов

Редакционная коллегия:

Н.Н. Беседнова, Б.И. Гельцер, Е.В. Елисеева, Ю.В. Каминский, Е.В. Крукович, Ю.В. Кулаков, В.Н. Лучанинова, Е.В. Маркелова (отв. секретарь), В.И. Невожай, В.А. Невзорова (зам. главного редактора), В.А. Петров, В.Г. Сейидов, Б.А. Сотниченко, В.Б. Туркутюков, Ю.С. Хотимченко, В.М. Черток (зам. главного редактора), В.В. Шапкин, А.Д. Юцковский

Редакционный совет:

А.С. Белевский (Москва), А.Ф. Беляев, А.В. Гордеев, Ю.И. Гринштейн (Красноярск), С.Е. Гуляева, Н.А. Догадина, В.А. Иванис, Ю.И. Ишпахтин, В.П. Колосов (Благовещенск), Д.Б. Ларионова, В.Ю. Мареев (Москва), В.Я. Мельников, П.А. Мотавкин, А.Я. Осин, А.А. Полежаев, Б.Я. Рыжавский (Хабаровск), Л.М. Сомова, Г.И. Суханова, Н.Д. Татаркина, Л.Н. Трусова, Г.И. Цывкина, Jin Liang Hong (КНР), Moon oh Riin (Республика Корея), Yamamoto Masaharu (Япония), Zhao Baochang (КНР)

Научный редактор О.Г. Полушин

«Тихоокеанский медицинский журнал», 2008, № 2 (32)

Тихоокеанский медицинский журнал <i>Учредители:</i> Владивостокский государственный медицинский университет, Департамент здравоохранения администрации Приморского края, НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Краевой клинический центр охраны материнства и детства <i>Свидетельство о регистрации</i> <i>Министерства РФ по делам печати,</i> <i>телерадиовещания и средств массовых</i> <i>коммуникаций</i> <i>ПИ № 77–13548 от 20.09.2002 г.</i>	Адрес редакции: 690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 4, Владивостокский государственный медицинский университет Тел./факс (4232) 45-77-80 Редактор О.Н. Мишина Зав. редакцией Л.В. Бирилло Технический редактор А.В. Яунвалкс Тел. (4232) 45-56-49 Корректор О.М. Тучина	Издательство «МЕДИЦИНА ДВ» 690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 4; тел. 45-56-49 Сдано в набор 14.05.2008 г. Подписано в печать 6.06.2008 г. Печать офсетная. Формат 60×90/8 Усл. печ. л. 12,5. Заказ № 522. Тираж 1000 экз. Отпечатано ИД «Принт-Восток» в типографии № 1 г. Харбин (Китай) Цена свободная
---	--	---

Передовые статьи

Слонова Р.А., Кушнарева Т.В., Компанец Г.Г. Современные аспекты природной очаговости хантавирусной инфекции в Приморском крае	5
---	---

Лекции

Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Морозов В.Г., Юничева Ю.В., Слюсарева Г.П., Седова Н.С., Смирнов А.А., Коротина Н.А., Клемпа Б., Крюгер Д. Особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызываемой генетическими подтипами вируса Добrava/Белград в России	10
---	----

Иванис В.А.

Современные представления о патогенезе хантавирусной инфекции	15
--	----

Якименко В.В., Гаранина С.Б., Малькова М.Г., Валицкая А.В., Константинова Г.А., Танцев А.К., Лучко С.В., Матущенко А.А., Ирбаев Д.О., Платонов А.Е., Шипулин Г.А. Итоги изучения хантавирусов в Западной Сибири	20
--	----

Тюлько Ж.С., Якименко В.В.

К вопросу о темпах эволюции хантавирусов генотипа Пуумала	27
--	----

Обзоры

Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Компанец Г.Г., Слонова Р.А. Роль клеток моноцитарного происхождения в патогенезе хантавирусных инфекций	32
--	----

Чубукова О.В., Никоноров Ю.М.

Перспективы применения ДНК-вакцин в профилактике хантавирусных инфекций	37
--	----

Аленов А.В., Борзов В.П., Краснощеков В.Н., Боровская Н.А., Кушнарева Т.В., Киряков В.Ю. Сочетанность природных очагов туляремии, лептоспироза и хантавирусной инфекции в экосистемах Приморского края	40
--	----

Оригинальные исследования

Сокогутун С.А., Захарина И.В., Афанасьева В.И., Иванис В.А., Сокогутун О.А. Клинико-эпидемиологические особенности хантавирусной инфекции в Приморском крае	43
--	----

Яшина Л.Н., Иванов Л.И., Слонова Р.А., Компанец Г.Г., Гуторов В.В., Кушнарева Т.В., Высочина Н.П., Абрамов С.А., Дупал Т.А., Пуховская Н.М., Здановская Н.И. Хантавирусы, циркулирующие в полевках <i>Microtus Fortis</i> и <i>Microtus Maximowiczii</i>	47
--	----

Кушнарева Т.В.

Эпизоотологический потенциал мышевидных грызунов в природных очагах хантавирусной инфекции и его эпидемиологическое значение	50
--	----

Симонов С.Б., Слонова Р.А., Симонов П.С., Симонова Т.Л. Формирование очагов хантавирусной инфекции под влиянием природно-антропогенной трансформации лесов в Приморском крае	53
---	----

Кушнарева Т.В., Слонова Р.А.

Роль прямого пути передачи хантавирусов – возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом среди мышей рода <i>Apodemus</i>	57
--	----

Компанец Г.Г.

Биологические свойства хантавирусов, циркулирующих в Приморском крае	61
---	----

Зайцева Е.А., Ермолаева С.А., Сомов Г.П.

Распространение <i>Listeria monocytogenes</i> среди мышевидных грызунов на территории Приморского края	65
---	----

Образцов Ю.Г., Попов А.Ф., Иванис В.А., Кушнарева Т.В.

Этиотропная терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом	69
---	----

Сомова Л.М., Слонова Р.А., Фигурнов В.А.,
Марунич Н.А., Плехова Н.Г., Гаврилов А.В.,
Дробот Е.И., Фигурнова Е.В.

Патоморфогенетические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом в дальневосточном регионе	72
--	----

Фигурнов В.А., Марунич Н.А.,
Гаврилов А.В., Фигурнова Е.В.

Особенности клинического проявления и некоторые закономерности патогенеза при тяжелом течении геморрагической лихорадки с почечным синдромом	76
--	----

Максема И.Г., Компанец Г.Г.,
Кушнарева Т.В., Слонова Р.А.

Гуморальные факторы иммунного ответа у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Приморском крае	79
--	----

Иунихина О.В., Компанец Г.Г., Слонова Р.А.

Клинико-эпидемиологические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом при разных условиях заражения хантавирусами	82
---	----

Максема И.Г., Макаренкова И.Д.

Противовирусная активность фукоиданов природного происхождения при экспериментальной инфекции, вызванной хантавирусом	86
---	----

Методика

Мухаметханов Н.Х., Баймиев А.Х.

Получение рекомбинантного белка G2 хантавируса серотипа <i>Puumala</i>	89
---	----

Педагогика

Чжан Лили, Ли Ливэй

Методические приемы в обучении русскому языку в Китае	92
--	----

Чертков Д.В., Чертков В.М.

Парки и их роль в создании инновационного потенциала вузовской науки	95
---	----

Шуматов В.Б., Крукович Е.В., Осин А.Я., Садова Н.Г.

Внедрение результатов научно-исследовательской работы в педагогическую деятельность преподавателей медицинского вуза	98
--	----

Editorials

<i>Slonova R.A., Kushnareva T.V., Kompanets G.G.</i> Modern aspects of the natural reservoir of the hantaviral infection in Primorsky Krai.....	5
---	---

Lectures

<i>Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Morozov V.G., Junicheva Yu.V., Slyusareva G.P., Sedova N.S., Smirnov A.A., Korotina N.A., Klempa B., Kryuger D.</i> Specific features of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, caused by genetic subtypes of virus Dobrava/Belgrad in Russia	10
---	----

Ivanis V.A.

Modern representations about the pathogenesis of the hantaviral infection	15
--	----

<i>Jakimenko V.V., Garanina S.B., Malkova M.G., Valitskaya A.V., Konstantinova G.A., Tantsev A.K., Luchko S.V., Matushchenko A.A., Irbaev D.O., Platonov A.E., Shipulin G.A.</i> Results of Hantavirus studying in Western Siberia.....	20
--	----

Tyulko Z.S., Jakimenko V.V.

To a question on evolution of the <i>Hantavirus</i> genotype <i>Puumala</i>	27
---	----

Reviews

<i>Plehova N.G., Somova L.M., Kompanets G.G., Slonova R.A.</i> Role of monocyte cells in pathogenesis of the hantaviral infection	32
---	----

Chubukova O.V., Nikonorov Yu.M.

Prospects of application of DNA-vaccines in preventive maintenance of the hantaviral infection	37
---	----

<i>Allenov A.V., Borzov V.P., Krasnoshchekov V.N., Borovskaja N.A., Kushnareva T.V., Kiryakov V.Yu.</i> Coincidence of the natural reservoirs of the tularemia, leptospirosis and the hantaviral infection in the ecologic systems of the Primorsky Krai.....	40
--	----

Original researches

<i>Sokotun S.A., Zaharina I.V., Afanas'eva V.I., Ivanis V.A., Sokotun O.A.</i> Clinic and epidemiological features of the hantaviral infection in Primorsky Krai.....	43
---	----

<i>Yashina L.N., Ivanov L.I., Slonova R.A., Kompanets G.G., Gutorov V.V., Kushnareva T.V., Vysochina N.P., Abramov S.A., Dupal T.A., Puhovska'a N.M., Zdanovska'a N.I.</i> Hanta viruses, circulating in mice <i>Microtus Fortis</i> and <i>Microtus Maximowiczii</i>	47
---	----

Kushnareva T.V.

Epyzootologic potential of the mice in the natural reservoirs of the hantaviral infection and its epidemiological value	50
---	----

Simonov S.B., Slonova R.A., Simonov P.S., Simonova T.L.

Formation of the reservoirs of the hantaviral infection under the influence of the natural-anthropogenous transformation of woods in Primorsky Krai	53
---	----

Kushnareva T.V., Slonova R.A.

Role of a direct way of transfer of the hantaviral infection as an activators of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome among mice <i>Apodemus</i>	57
---	----

Kompanets G.G.

Biological properties of the hantavirus, circulating in Primorsky Krai.....	61
--	----

Zaitseva E.A., Ermolaeva S.A., Somov G.P.

Distribution of the <i>Listeria monocytogenes</i> in mice in territory of Primorsky Krai.....	65
--	----

Obraztsov Yu.G., Popov A.F., Ivanis V.A.

Etiologic therapy of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome	69
---	----

Somova L.M., Slonova R.A., Figurnov V.A., Marunich N.A.,

<i>Plehova N.G., Gavrilov A.V., Drobot E.I., Figurnova E.V.</i> Pathomorphogenetic features of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome in Far East region	72
---	----

Figurnov V.A., Marunich N.A., Gavrilov A.V., Figurnova E.V.

Features of clinical signs and pathogenesis at severe hemorrhagic fever with nephritic syndrome.....	76
---	----

Maksema I.G., Kompanets G.G., Kushnareva T.V., Slonova R.A.

Humoral factors of the immune answer at patients with hemorrhagic fever with nephritic syndrome in Primorsky Krai	79
---	----

Iunihina O.V., Kompanets G.G., Slonova R.A.

Clinical and epidemiological features of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome under different conditions of infection by hantaviruses.....	82
---	----

Maksema I.G., Makarenkova I.D.

Antiviral activity of fukoidans of natural origin at the experimental infection caused by Hantavirus	86
---	----

Technique

Muhamethanov N.H., Bajmiev A.H.

Synthesis of the recombinant protein G2 of the Hantavirus serotype <i>Puumala</i>	89
--	----

Pedagogics

Zhan Lili, Li Liway

Methodical tactics in training Russian in China	92
---	----

Chertok D.V., Chertok V.M.

Parks and their role in creation of innovative potential of a high school science.....	95
---	----

Shumatov V.B., Krukovich E.V., Osin A.Ya., Sadova N.G.

Introduction of results of research work in pedagogical activity of teachers of medical high school.....	98
---	----

УДК 616.98:578.883.29]-06:616.61-002.151-022-036.22(571.63)

Р.А. Слонова, Т.В. Кушнарева, Г.Г. Компанец

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПРИРОДНОЙ ОЧАГОВОСТИ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

Ключевые слова: хантавирусы, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, эпизоотический процесс, природная очаговость.

В результате многолетних наблюдений в очагах хантавирусной инфекции с использованием современных методов исследования обоснованы важные аспекты природной очаговости геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Представлена характеристика структурных компонентов в очагах разных ландшафтных зон и данные о генетическом составе хантавирусов и мышевидных грызунов – носителей вирусов. Обозначены факторы, влияющие на состояние и активность функционирования природного очага. Определены условия и периоды наиболее активного размножения хантавирусов у мышевидных грызунов и выделения его во внешнюю среду.

Начало изучения хантавирусной инфекции в нашей стране было положено в 30-е годы прошлого столетия после описания В.А. Тарганской случаев своеобразного заболевания почек у больных в Хабаровске [10], а также у военнослужащих в Приморском крае [2]. Доказательства нозологической самостоятельности заболевания, первоначально названного «геморрагический нефрозо-нефрит» и известного в настоящее время как геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), впервые были представлены в 1935 г. В.П. Чуриловым [11].

В эти же годы, на основании зоолого-эпидемиологических наблюдений, возникло предположение о возможной роли диких мышевидных грызунов в качестве источников инфекции. Однако получение прямых доказательств принадлежности ГЛПС к болезням с природной очаговостью стало возможным только после сообщения Н.В. Lee et al. [21] о выделении вируса *Hantaan*, представляющего в настоящее время самостоятельный род *Hantavirus* в семействе *Bunyaviridae*, а также после разработки специфических методов диагностики инфекции [27].

На территории Приморского края с использованием специфических методов исследования в течение 1980–2006 гг. были проведены исследования по изучению экологии хантавируса, его распространения в разных ландшафтных зонах региона, по выявлению структурных компонентов очагов, а также раскрытию закономерностей их функционирования и эпидемиологического проявления инфекции. Результаты, касающиеся некоторых аспектов природной очаговости хантавирусной инфекции, полученные в течение многолетних исследований с использованием новейших методических подходов, отражены в данной статье.

Представления о сущности природной очаговости хантавирусной инфекции были получены при

исследовании материала от 33478 особей мелких млекопитающих и 283 птиц, отловленных при многолетних стационарных и разовых обследованиях участков очаговой территории с охватом всех административных районов Приморского края. Материал от мышевидных грызунов собирали на всех фазах (депрессия, нарастание, пик и спад) их популяционных циклов. Для подтверждения зараженности животных хантавирусами выявляли антиген вируса в органах, используя твердофазный иммуноферментный анализ, а также антитела с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител. Генотипирование и установление степени родства между хантавирусами, циркулирующими в регионе, осуществляли с помощью анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей участков трех сегментов вирусной РНК.

К настоящему времени спонтанное заражение хантавирусом на территории края выявлено у млекопитающих – представителей 5 отрядов, 9 семейств, 17 видов. Установлено, что основным структурным компонентом природных очагов хантавирусной инфекции в регионе является широко распространенная группа мышевидных грызунов 5 видов: полевая мышь (*Apodemus agrarius* Pall.), восточно-азиатская мышь (*Apodemus peninsulae* Pall.), красно-серая (*Myodes rufocanus*), красная (*Myodes rutilus*) и дальневосточная (*Microtus fortis*) полевки [8]. Первые три вида имеют широкое распространение на равнинной и лесопокрытой территории региона, в то время как красная и дальневосточная полевки территориально ограничены. О значении других серопозитивных видов млекопитающих как резервуаров хантавирусов (хищников, парнокопытных, зайцеобразных) и птиц как структурных компонентов хантавирусных очагов из-за единичных находок, а также отсутствия данных о размножении хантавируса в их организме пока говорить сложно.

Инфицированные мышевидные грызуны были обнаружены на 376 участках очаговой территории, что свидетельствовало о повсеместном распространении хантавирусов в Приморском крае. Для удобства анализа структуры природных очагов инфекции на территории края, с учетом комплекса ландшафтных характеристик, выделено три типа местообитания грызунов: очаги лугополевого, горно-таежного типов, долинных и предгорных лесов. Типирование очагов хантавирусной инфекции на ландшафтной

основе с учетом состава родентосообществ, обитающих в разных типах очагов, имеет теоретическое и практическое значение, в частности, для более дифференцированного эпизоотологического прогнозирования и проведения профилактических мероприятий.

В указанных типах очагов установлены качественные различия в составе родентосообществ. В очагах лугополевого типа роль основных резервуаров хантавируса играет полевая мышь, содоминирующим ей видом является дальневосточная полевка. В очагах долинных и предгорных лесов, а также в местообитаниях горно-таежного типа доминирует восточно-азиатская мышь, содоминантом выступают красно-серая и красная полевки [3]. Безусловно, очаги не являются изолированной системой для определенных видов грызунов и представители лугополевого комплекса при массовом размножении могут встречаться на лесопокрытой территории, так же как и грызуны очагов лесного типа — в лугополевых очагах. Однако численность и инфицированность грызунов в несвойственных для видов очагах остается намного ниже, чем в оптимальных.

На основании молекулярно-генетического анализа фрагментов вирусной РНК, изолированной непосредственно из органов инфицированных грызунов и сгустков крови больных ГЛПС, на территории региона выявлена циркуляция генетически гетерогенной популяции вируса. К настоящему времени ее структура представлена генотипом вируса *Amur* и дальневосточными геновариантами известных генотипов: геновариант *Far East* вируса *Hantaan*, *Shkotovo* вируса *Puumala*, *Gorodechnoe* вируса *Khabarovsk* и *VDV* вируса *Seoul* [12, 29]. Для каждого генотипа и геноварианта установлена специфическая гостальность — связь их с определенным видом грызуна. Природным носителем вируса *Amur* является восточно-азиатская мышь, геноварианта *Far East* — полевая мышь, *Shkotovo* — красно-серая полевка, *Gorodechnoe* — дальневосточная полевка, *VDV* — серая крыса. Ареал генотипов и геновариантов хантавирусов, с учетом их специфической гостальности, совпадает с распространением мышевидных грызунов — носителей вируса.

При сравнении степени гомологии нуклеотидных и аминокислотных последовательностей фрагментов М и S сегментов вирусной РНК, выделенной из органов грызунов и крови больных ГЛПС, было установлено значение в этиологии заболевания генотипа *Amur* и геновариантов *Far East* и *VDV* [8, 29]. Случаев заболевания, обусловленных геновариантами *Gorodechnoe* и *Shkotovo*, на территории Приморского края до настоящего времени не выявлено.

В характере проявления эпизоотического процесса при хантавирусной инфекции в популяциях мышевидных грызунов отмечается цикличность — чередование подъемов и спадов его активности. Как правило, активизация эпизоотии в популяциях грызунов

совпадает с подъемом их численности и достигает высокой активности в годы массового размножения вида — носителя вируса. Эта закономерность отмечается не только в дальневосточных очагах хантавирусной инфекции, но и на европейской территории [5, 13, 15]. В популяциях эпидемически значимых для Приморского края мышей рода *Apodemus* нарастание активности эпизоотического процесса, который отражается на повышении уровня заболеваемости, чаще отмечается асинхронно в разные временные периоды: для полевой мыши с интервалом в 2–3 года, для восточно-азиатской мыши — 4–5 лет [3, 8]. В то же время в отдельные годы может отмечаться синхронное проявление активности эпизоотического процесса в популяциях полевой и восточно-азиатской мышей. В таких ситуациях заболеваемость ГЛПС в регионе регистрируется в очагах разных типов во многих районах края.

Выявлены некоторые особенности пространственной организации очаговых систем хантавирусной инфекции. В частности, концентрация инфицированных мышевидных грызунов на небольших локальных участках при единичных находках или отсутствие таковых на других. При обследовании такого участка очаговой территории площадью более 2 км² из отловленных 6 грызунов антиген хантавируса был обнаружен у 5 зверьков. В то же время у 71 грызуна, добытого на прилегающей площади 2 км², спонтанно инфицированных особей не обнаружено. Показано, что на дистанции протяженностью 5 км, где проводился отлов грызунов, расстояние между двумя локальными участками с концентрацией до 82% инфицированных особей не превышало 2,5 км. Места концентрации инфицированных грызунов совпадали с участками как высокой — 25 и более особей на 100 л/с*, так и средней — не более 12 особей на 100 л/с численности [3, 4]. В известной мере эти данные объясняют факт случайности заражения во время пребывания человека в очагах инфекции и свидетельствуют о возможности концентрации хантавируса во внешней среде в период выделения его грызунами с экскретами (фекалии, моча).

Наблюдения в течение ряда лет за участками концентрации инфицированных грызунов показали, что элементы пространственной структуры очагов сохраняют свою устойчивость в относительно узких временных рамках. В то же время даже в условиях депрессии численности грызунов остаются участки, где попадаемость и инфицированность зверьков, то есть эпизоотический потенциал вида — носителя хантавируса, довольно высоки.

Среднегодовые показатели численности в год пика у полевой мыши достигали 20,2 особей на 100 л/с, инфицированность 1,3 особи на 100 л/с. Для восточно-азиатской мыши эти показатели колебались в диапазоне 29 особей и 18,4 на 100 л/с. В годы депрессии

* Ловушко/суток.

попадаемость не превышала 5–7 особей на 100 л/с, а инфицированность у обоих видов в среднем составляла 0,3–0,5 особей на 100 л/с [3, 6].

Установлено, что при практически сходных среднегодовых процентах инфицированности грызунов показатели в пересчете на 100 л/с имели существенные различия. В связи с этим для обоснования эпизоотологического и эпидемиологического прогнозов в условиях распространения на очаговой территории двух видов грызунов – носителей патогенных штаммов хантавируса – целесообразно учитывать показатели уловистости обоих видов и инфицированности особей на 100 л/с.

Многолетние данные позволили отметить, что спад эпизоотического процесса в оптимальных биотопах наблюдается при показателях уловистости грызунов – носителей хантавируса – менее 7 особей на 100 л/с, а инфицированности – менее 1 особи на 100 л/с. Показатели заболеваемости ГЛПС в очагах сельского эпидемиологического типа в этот период не превышали 2,2 на 100 тыс. населения. Подъем уровня заболеваемости в 2005 г. до 7,2 на 100 тыс. населения наблюдался на фоне активного эпизоотического процесса в популяциях восточно-азиатской мыши при показателях среднегодовой численности до 20,5 особи на 100 л/с, инфицированности – 5,6 особи на 100 л/с.

Выявлены некоторые факторы, влияющие на активность эпизоотического процесса в популяции мышевидных грызунов. В частности, отмечена зависимость показателей их инфицированности от возраста и времени рождения [3, 6]. В годы подъема численности полевой мыши доля в отловах особей первых 2 месяцев жизни в летний период составляла от 40,5 до 86%, в год спада численности – 36,8%. Аналогичная картина отмечалась и у восточно-азиатской мыши: 63,5% в год нарастания и 33,8% в год спада. Среди грызунов в возрасте старше 4 месяцев носительство хантавируса наблюдалось в 5,4 раза чаще по сравнению с грызунами, не достигшими этого возраста.

Доля инфицированных грызунов в структуре популяции носителей хантавируса зависела также от сроков рождения зверьков. Специфический антиген в легких грызунов присутствовал в 2,1 раза чаще ($p < 0,001$) у грызунов, родившихся весной и в начале лета, по сравнению с родившимися с июля по сентябрь. Характерно, что в годы пика численности количество молодых особей к началу лета возрастало быстро, а в условиях выхода из депрессии доля в отловах молодых особей достигала максимума к осени. Сходные данные о влиянии демографических факторов на проявление хантавирусной эпизоотии в популяциях рыжей полевки (*Myodes glareolus*) были получены А.Д. Бернштейн и др. (2001) в европейских очагах ГЛПС [1, 13].

Наблюдается зависимость спонтанной инфицированности мышевидных грызунов от репродуктивного состояния. Частота инфицированных самцов,

достигших половозрелости, у полевой мыши, была в 12,1, а у восточно-азиатской мыши в 3,6 раза выше, чем среди неполовозрелых особей. При сравнении соотношения числа инфицированных самцов и самок в популяциях полевой и восточно-азиатской мышей установлено, что в весенне-летний период в структуре инфицированных грызунов преобладали самцы, в то же время доля антиген-носителей среди самок заметно возросла (в 2,8 раза) осенью.

Инфекционный процесс у экспериментально и естественно зараженных мышевидных грызунов при хантавирусной инфекции, как показано в некоторых работах, характеризуется накоплением вирусного антигена в легких, печени, почках, селезенке, буром жире, слюнных железах, кишечнике, мочевом пузыре и выработкой антител в крови [1, 14, 15, 17, 21, 28].

На территории Приморского края присутствие специфического антигена и инфекционного вируса в органах выделения (почках, слюнных железах, кишечнике) и экскретах у грызунов природной популяции было подтверждено при находках в пробах антигена при иммуноферментном анализе, выделением вируса из слюнных желез на культуре клеток Vero E 6, а также обнаружением геномной РНК в образцах слюнных желез [7, 9].

Учитывая данные ряда авторов об успешной изоляции хантавируса от экспериментально инфицированных грызунов и о наличии высокой вирусной нагрузки в первый месяц после заражения [14, 17, 20, 21, 24], можно полагать, что находки специфического антигена и геномной РНК в органах экскреции грызунов природной популяции могут свидетельствовать об острой стадии инфекции на момент исследования с активной диссеминацией вируса в окружающую среду. Важно отметить, что выделение вируса в острый период со слюной, как показали R. Yanagihara et al. (1985), совпадало при экспериментальных наблюдениях с горизонтальной передачей вируса при подсадке в клетки с инфицированными животными здоровых мышей [28]. Следовательно, в период острого проявления хантавирусной инфекции наиболее вероятно распространение вируса среди грызунов при контактах.

На фоне высокой численности полевой мыши в очагах Приморского края при среднегодовой зараженности хантавирусом 16,6% доля с антигеном вируса в органах выделения среди обследованных животных достигала 10,3%. Число грызунов, выделяющих хантавирус во внешнюю среду, весной составило 4,4%, летом – 7,9%, а в осенне-зимний период достигало 19,3%.

В годовой динамике хантавирусной эпизоотии в год пика численности полевой мыши активность выделения вируса во внешнюю среду нарастала от весны к осени. На следующий год на фоне снижения численности грызунов отмечался рост доли особей со специфическими антителами.

В возрастной структуре грызунов, выделяющих хантавирус в окружающую среду, преобладали особи ранне-весенних и ранне-летних пометов, достигающие у восточно-азиатской мыши высокой плотности к июню-августу, у полевой к августу-сентябрю. Активная стадия инфекционного процесса с выделением хантавируса во внешнюю среду отмечалась у 53,1% среди серопозитивных сеголеток и у 19,2% перезимовавших особей.

Возможная диссеминация хантавируса во внешнюю среду, на что указывают данные обнаружения специфического антигена и вирусной РНК в органах выделения, отмечалась среди грызунов определенных возрастных групп. В год подъема популяционного цикла находки антигена хантавируса в органах выделения среди инфицированных животных в возрастной группе 3–4 месяца достигали 60%.

Данные о ходе развития эпизоотического процесса, полученные при исследовании двух видов грызунов: полевой и восточно-азиатской мышей — носителей патогенных для человека генотипов хантавируса в условиях Приморского края, свидетельствуют о том, что в активной его стадии отмечается рост доли зверьков с антигеном в легких и других органах, в том числе экскретирующих вирус во внешнюю среду, а также присутствие у значительной части грызунов антител низкой avidности [9, 23], что отражает факт недавнего инфицирования. В фазу затухания хантавирусной эпизоотии в популяциях грызунов преобладает число особей с антигеном только в легких и наличием в крови антител высокой avidности, что с большей долей вероятности отражает переход к хронической стадии бессимптомной персистенции вируса и ограничению выделения его в окружающую среду.

На наш взгляд, при проведении мониторинга в природных очагах на основании данных обнаружения антигена хантавируса в легких и специфических антител в крови оценка состояния эпизоотии не дает необходимой информации о сроках и активности выделения хантавируса во внешнюю среду. В то же время этой информацией необходимо располагать для прогноза времени повышенного риска заражения хантавирусом и трансмиссии его среди грызунов.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что популяция хантавируса в природных очагах может быть представлена двумя составляющими: «организменной» (эволюционно ассоциированной с мышевидными грызунами) и «внеорганизменной», которая от инфицированных грызунов с мочой, фекалиями и слюной попадает во внешнюю среду. Надо отметить, что в последние годы вопросу выявления хантавируса в экскретирующих органах уделяется повышенное внимание, появились сообщения о находках хантавируса во внешней среде и даже его сохранении при определенных условиях на некоторых зараженных субстратах [14, 16, 17, 18, 25, 26].

Именно вторая составляющая природной популяции хантавируса имеет основное значение в эпидемиологии ГЛПС, поскольку ведущим путем заражения, что признано в настоящее время, является воздушно-пылевой. Воздушно-пылевому пути придается важное значение также в передаче хантавируса в популяциях мышевидных грызунов при контактах [18, 26].

Подтверждение реализации воздушно-пылевого пути заражения хантавирусом в очагах Приморского края было получено при обнаружении РНК хантавируса в 3 из 27 проб воздуха, отобранных весной с помощью воздухозаборника, содержащего 10 мл среды МЭМ с 2% сыворотки эмбрионов коров. Специфическая РНК была обнаружена в пробах воздуха, взятых в подвальных помещениях и надворной постройке в сельской местности [19]. В зимний период в этих помещениях отмечалось присутствие грызунов, которые обычно в холодное время года мигрируют в жилище человека [13].

Ранее о присутствии хантавируса в воздухе помещений, где содержались экспериментально зараженные хантавирусом грызуны, сообщали L. Luo et al. (1993), которым удалось из проб воздуха, собранных в помещении, выделить вирус на клеточной культуре [22]. Данные о возможности связывания вируса с пылевыми частицами воздуха были подтверждены в наших экспериментальных исследованиях по способности хантавируса адсорбироваться на мелких частицах бентонита и цеолита, которые являются составляющими многих пород почв, а также непосредственно на пробах почв. Исследования по изучению присутствия и сроков выживания хантавирусов в абиотических компонентах внешней среды важны для ответа на многие вопросы об эпидемиологии этой инфекции и влиянии на биологические свойства возбудителя условий его существования вне организма хозяина.

Таким образом, приведенные данные позволяют в настоящее время с позиции учения о природной очаговости болезней считать природным очагом хантавирусной инфекции географический ландшафт с популяцией хантавируса и в комплексе с поддерживающими ее существование позвоночными хозяевами наземных экосистем. Структурно природный очаг хантавирусной инфекции представлен популяцией разнообразных генотипов хантавирусов и разными видами мышевидных грызунов, эволюционно ассоциированных со свойственным каждому виду вирусом.

Механизм существования хантавируса в двухчленной паразитарной системе обеспечивается природой взаимодействия его с грызуном-хозяином, характеризующийся бессимптомной персистенцией инфекции, которая в определенных условиях переходит из острого периода в фазу хронической персистенции. Внешняя среда, куда хантавирус попадает от грызунов с инфицированными экскретами и секретами, по всей

вероятности, на какой-то период становится местом резервации хантавируса, сохраняя его при глубоких депрессиях численности грызунов. Не исключено, что за счет сохранения вируса во внешней среде естественных убежищ поддерживается его трансмиссия в популяциях грызунов. F. Sauvage et al. (2003), основываясь на данных математического моделирования, считают, что в условиях резкого снижения численности грызунов непрямая передача хантавируса грызунам через загрязненную внешнюю среду является важным условием сохранения вируса для поддержания его циркуляции в очагах [26]. Вопрос, как долго вирус сохраняется вне организма основного хозяина, остается пока открытым.

На настоящем этапе изучения хантавирусов значительное внимание уделяется раскрытию механизмов взаимодействия возбудителя с грызуном — его хозяином, что позволит, при условии подключения генно-инженерных методов исследования, выявить критерии развития и оценки активности эпизоотического процесса на разных фазах динамики популяций.

Литература

1. Бернштейн А.Д., Апекина Н.С., Михайлова Т.В. // *Мед. паразитол. и параз. болезни.* — 2001. — № 4. — С. 55–58.
2. Бирюков Л.В. // *Труды Владивостокского воен. госпитала.* — 1941. — С. 101–107.
3. Косой М.Е. Эколого-эпидемиологическая характеристика природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом : автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1987.
4. Кушнарв Е.Л., Косой М.Е., Слонова Р.А. // *Природно-очаговые болезни.* — Омск, 1989. — С. 124–128.
5. Рыльцева Е.В., Ткаченко Е.А., Степаненко А.Г., Мустафин Н.М. // *Тезисы Международного симпозиума по ГЛПС.* — Ленинград, 1991. — С. 4.
6. Симонова Т.Л., Кушнарв Т.В., Симонов С.Б. и др. // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* — 2006. — № 3, прил. — С. 81.
7. Слонова Р.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом на юге Дальнего Востока России (вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1993.
8. Слонова Р.А., Астахова Т.И., Компанец Г.Г. // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* — 1997. — № 5, прил. — С. 97–101.
9. Слонова Р.А., Кушнарв Е.Л., Косой М.Е. и др. // *Вопр. вирусол.* — 1990. — № 3. — С. 250–253.
10. Тарганская В.А. // *Тр. Дальневосточного мед. института.* — 1935. — Т. 2. — С. 156–161.
11. Чурилов А.В. // *Клиническая медицина.* — 1941. — № 19. — С. 7–8.
12. Яшина Л.Н. // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* — 2006. — № 3. — С. 78–81.
13. Bernstein A.D., Apekina N.S., Mikhailova T.V. et al. // *Arch. Virol.* — 1999. — Vol. 44, iss. 12. — P. 2415–2428.
14. Botten J., Mirowsky K., Kusewitt D. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 12, No. 19. — P. 10578–10583.
15. Gavrilovskaya I.N., Apekina N.S., Bernstein A.D. et al. // *Arch. Virol.* — 1990. — No. 1, suppl. — P. 57–62.
16. Hardestam J., Simon M., Hedlund K.O. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007. — Vol. 73, No. 8. — P. 2547–2551.
17. Hutchinson R.L., Rollin P.E., Peters C.J. // *J. Trop. Med. Hyg.* — 1998. — Vol. 59, No. 1. — P. 58–65.
18. Kallio E.R., Klingstrom J., Gustafsson E. et al. // *J. Gen. Virol.* — 2006. — Vol. 87. — P. 2127–2134.
19. Kushnareva T.V., Iunikhina O.V., Slonova R.A. // *X Int. Symp. Control Epidemic of illness transmit by vectors : abstracts.* — Buenos Aires (Argentina), 2007. — P. 47.
20. Lee H.W., Lee P.W., Baek L.J. et al. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* — 1981. — Vol. 30, No. 5. — P. 1106–1112.
21. Lee H.W., Lee P.W., Johnson K. // *J. Infect. Dis.* — 1978. — Vol. 137. — P. 298–308.
22. Luo Z.Z., Liu Y.F. // *Proceedings of Int. symp. on Hemorrhagic Fever with renal syndrome.* — Hubei (China), 1988. — P. 34.
23. Maksyoma I., Kushnareva T., Slonova R.A. // *X International Symp. Control Epidemic of illness transmit by vectors : abstracts.* — Buenos Aires (Argentina), 2007. — P. 50.
24. Mayer B., Schmaljohn C.S. // *Trends in Microbiol.* — 2000. — Vol. 8, No. 2. — P. 61–67.
25. Safronetz D., Lindsay R., Dibbernardo A. et al. // *Vector Borne Zoonotic Diseases.* — 2005. — Vol. 5, No. 2. — P. 127–132.
26. Sauvage F., Langlain M., Yoccoz G., Pontier D. // *Animal Ecol.* — 2003. — Vol. 72. — P. 1–13.
27. Schmaljohn C., Hjelle B. // *Emerg. Infect. Dis.* — 1997. — Vol. 3, No. 2. — P. 95–104.
28. Yanagihara R., Amyx H.L., Gajdusek D.C. // *J. Virol.* — 1985. — Vol. 55, No. 1. — P. 34–38.
29. Yashina L., Patrushev N., Ivanov L. et al. // *Arch. Virol.* — 2000. — Vol. 70, iss. 1–2. — P. 31–44.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

MODERN ASPECTS OF THE NATURAL RESERVOIR OF THE HANTAVIRAL INFECTION IN PRIMORSKI KRAI
R.A. Slonova, T.V. Kushnareva, G.G. Kompanets
Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok)

Summary — As a result of long-term supervision in the centers of the Hantavirus infection with use of modern methods of research the prominent aspects of the natural reservoir of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome are proved. The characteristic of structural components in the centers of different landscape zones and the data on genetic structure Hantavirus and rodents — carriers of viruses is submitted. The factors influencing a condition and activity of functioning of the natural center are designated. Conditions and the periods of the most active duplication Hantavirus infection at rodents and its allocation in an environment are determined.

Key words: Hantavirus, hemorrhagic fever with nephritic syndrome, epizootic process, natural reservoir.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 5–9.

УДК 616.98:578.833.29]:616.61-008.6-07(572.62)

Е.А. Ткаченко¹, Т.К. Дзагузова¹, В.Г. Морозов², Ю.В. Юничева³, Г.П. Слюсарева⁴, Н.С. Седова¹, А.А. Смирнов¹, Н.А. Коротина¹, Б. Клемпа⁵, Д. Крюгер⁵

¹ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН (Московская обл.),

² Самарский военно-медицинский институт, ³ Сочинское противочумное отделение Причерноморской ПЧС Роспотребнадзора, ⁴ Липецкая городская клиническая больница, ⁵ Институт вирусологии (Берлин, Германия)

ОСОБЕННОСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ПОДТИПАМИ ВИРУСА ДОБРАВА/БЕЛГРАД В РОССИИ

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, вирус Добрава, Сочи, Липецкая область.

В результате комплексных клинико-эпидемиологических, иммунологических и молекулярно-генетических исследований была установлена циркуляция в районе Сочи нового подвида вируса Добрава DOBV-Ар, основным хозяином которого и источником заражения людей является кавказская лесная мышь *Apodemus ponticus*. Вызванные этим вирусом заболевания у людей имели определенные отличия клинических проявлений и характеризовались более тяжелым течением, чем заболевания геморрагической лихорадкой с почечным синдромом у жителей центральных областей России, этиологически обусловленные подвидом DOBV-Aa.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — острая вирусная природно-очаговая зоонозная инфекция человека, представляющая серьезную проблему в связи с широким распространением, тяжестью болезни, отсутствием эффективных средств этиотропной терапии и специфической профилактики. Заболевание характеризуется циклическим течением, синдромом интоксикации, системным поражением мелких сосудов, своеобразным поражением почек (интерстициальный нефрит) с развитием острой почечной недостаточности.

Подавляющее число случаев ГЛПС в европейских регионах России обусловлено заражением вирусом Пуумала и около 3% — вирусом Добрава/Белград (Добрава). Вирус Добрава до 1997 г. ассоциировали лишь с заболеванием людей ГЛПС на территории бывшей Югославии [8], где основным хозяином этого вируса и источником заражения является желтогорлая мышь, *Apodemus flavicollis*. Эпидемиологическая значимость вируса Добрава на территории европейской части России была впервые установлена в 1997 г. в результате ретроспективного обследования крови реконвалесцентов, заразившихся в 1991–1992 гг. в Рязанской и Тульской областях [2, 14]. Впоследствии ассоциированные с вирусом Добрава спорадические случаи заболевания были выявлены нами при ретроспективном серологическом исследовании сывороток крови больных и на других административных территориях России. Зимой 2001–2002 и 2006–2007 гг. в центральных областях России (Воронежская, Липецкая, Орловская, Тамбовская, Рязанская, Курская) были зарегистрированы крупные вспышки ГЛПС (всего около 800 случаев), этиологически обусловленные в подавляющем большинстве наблюдений вирусом Добрава. Основным хозяином вируса и ис-

точником заражения людей на вышеуказанных территориях оказалась полевая мышь *Apodemus agrarius*.

Подобные природные очаги ГЛПС, ассоциированные с теми же вирусом и видом грызуна, были выявлены в странах Центральной Европы [12]. При этом клиническое течение инфекции, вызванной геновариантом Добрава — *A. agrarius* (ДОБ-Aa), было более легким и практически не сопровождалось летальными исходами в отличие от заболевания, вызываемого геновариантом Добрава — *A. flavicollis*, (ДОБ-Af) у жителей Балканских стран и сопровождающегося довольно высокой летальностью [18, 19].

Еще один геновариант вируса Добрава (Саарема) был выделен от полевой мыши *A. agrarius* в Эстонии [15, 16]. Этиологическая роль этого вируса еще не установлена. В результате филогенетического анализа было показано, что штаммы, изолированные в Центральной Европе от желтогорлой мыши, образуют отдельную эволюционную ветвь ДОБ-Af, в то время как штаммы, выделенные от полевой мыши, не так однородны. При этом штаммы из Центральной Европы и Центральной России образуют ветвь ДОБ-Aa, отличающуюся от штаммов вируса Саарема из Северо-Восточной Европы [9, 10]. Эти генетические отличия, по видимому, коррелируют с вирулентностью штаммов и степенью патогенности для человека, которая варьирует от высокой (ДОБ-Af) до средней (ДОБ-Aa) или вовсе отсутствует (вирус Саарема). Еще более усложнилась картина эволюции и экологии вируса Добрава, когда был обнаружен его новый хозяин — кавказская лесная мышь *Apodemus ponticus*, обитающая в субтропической зоне Краснодарского края [7].

В настоящем сообщении представлены результаты сравнительного анализа клинического течения ГЛПС у больных, инфицированных вирусом Добрава в центральном и южном регионах Европейской части России, а также результаты исследования филогенетических и иммунологических взаимоотношений между генетическими вариантами этого вируса.

Серологические исследования. Первичный скрининг сывороток крови больных проводили непрямой методом иммунофлюоресценции с использованием коммерческого диагностикума «Культуральный поливалентный диагностикум ГЛПС для непрямого МФА» производства ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН. Положительные на присутствие хантавирус-

ных антител сыворотки типировали с помощью мовалентных культуральных антигенов вирусов Пуумала, Хантаан, Сеул и Добрава, а также с помощью реакции нейтрализации в культуре клеток VERO-E6 по методу выявления фокусобразующих единиц, описанному ранее [13].

Выделение хантавируса. Использовали описанную ранее методику, в соответствии с которой клетки VERO-E6 заражали 10% суспензией легочной ткани грызунов, содержащей по результатам предварительного исследования методом иммуноферментного анализа хантавирусный антиген [22]. В процессе слепых пассажей применяли МФА для выявления вирусоспецифического антигена в клетках, свидетельствующего о размножении хантавируса. При выделении штамма Aa1854/Липецк-02 вируса Добрава от полевой мыши начало размножения вируса было зарегистрировано на 32-й день, а штамма Ap1584/Сочи-01 от кавказской лесной мыши — на 70-й день после заражения клеток первичным материалом.

Полимеразная цепная реакция, секвенирование. Выделение вирусной РНК из культуральной жидкости инфицированных хантавирусами клеток VERO-E6 и получение к-ДНК копий осуществляли с помощью набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Германия) по стандартной методике производителя. Амплификация и секвенирование полных S- и М-сегментов, а также частично L-сегмента были выполнены по ранее описанной методике [11]. Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы CLUSTAL W [21]. Филогенетические деревья были построены с использованием алгоритма максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) и метода ближайших соседей (Neighbor-Joining) при помощи пакета TREE-PUZZLE 5.2 [17] и PAUP 4.0 Beta 10 [20] соответственно.

Анализ клинических данных. В результате серологического обследования сывороток крови от более 600 лихорадящих больных из района Большого Сочи (далее Сочи) и от больных с различными клиническими диагнозами из Липецкой области было выявлено соответственно 26 и 200 случаев ГЛПС, этиологически обусловленных вирусом Добрава. Истории болезни удалось проанализировать от 18 больных из Сочи и от 108 больных из Липецкой области.

В большинстве случаев больные ГЛПС, выявленные в Сочи, поступали в стационары в тяжелом состоянии с такими диагнозами, как тяжелая форма лептоспироза, острый гломерулонефрит, ОРВИ, ангина, лихорадка неясной этиологии. Больные постоянно проживали в населенных пунктах Большого Сочи, включая окрестности: г. Сочи — 3, Лазаревский район — 19, Адлерский район — 3, Хоста — 1. Более чем за месяц до заболевания никто из инфицированных за пределы региона не выезжал. Поскольку до начала наших исследований случаев заболевания ГЛПС в этом регионе официально не было зарегистрировано, подозрение на эту инфекцию у врачей не возникало.

Возрастной состав больных варьировал от 7 до 59 лет (19 мужчин и 7 женщин), включая 5 детей в возрасте до 16 лет. Не удалось установить какой-либо связи заболеваемости с профессиональной деятельностью больных, а также с определенным сезоном (спорадический характер заболеваемости отмечался в течение всего года). В противоположность этому вспышка ГЛПС в Липецкой области имела выраженную осенне-зимнюю сезонность и характеризовалась в основном заражениями населения при уходе за домашними животными по месту жительства или работы.

Сравнительный анализ клинико-лабораторных данных больных из двух географически различных регионов показал определенные отличия клинических проявлений, касающиеся частоты регистрации и выраженности ряда симптомов.

У большинства больных из Сочи отмечали признаки поражения желудочно-кишечного тракта в виде болей в животе, тошноты и рвоты, сопровождавшихся нередко диареей. В 4 раза чаще, чем у больных из Липецкой области, наблюдали увеличение печени, в 2 случаях развилась желтуха. Весьма существенным отличием является крайне редкое развитие полиурии у больных из Сочи. В то же время у этих больных значительно чаще возникали геморрагические проявления. Так, помимо субсклеральных гематом, у двух пациентов развилось желудочно-кишечное кровотечение при отсутствии других проявлений геморрагического синдрома. Возможно, эта особенность является характерной для клиники ГЛПС в Сочи, если исключить возможность пропуска отдельных проявлений геморрагического синдрома местными врачами. При сравнительном анализе показателей крови и мочи отмечены по крайней мере два существенных отличия — это частота лейкопении (33 и 10%) и изогипостенурии (5 и 99%) у больных из Сочи и Липецкой области соответственно. В целом анализ историй болезни показал, что в 55% случаев в Сочи болезнь протекала в тяжелой форме, закончившейся в одном случае летальным исходом, у 39% — в среднетяжелой форме и только у одного больного — в легкой форме. В Липецкой области у большинства больных (73%) имело место среднетяжелое и легкое течение болезни (табл. 1).

Серотипирование сывороток крови больных ГЛПС. При исследовании сывороток крови больных ГЛПС в МФА титры антител к вирусу Добрава были значительно выше, чем к вирусу Пуумала, в то же время достоверная дифференциация с вирусами Хантаан и Сеул была возможна только при исследовании сывороток в реакции нейтрализации. Кроме того, отличительные особенности эпидемиологии и клиники ГЛПС, а также видов грызунов — источников заражения наводили на мысль об отличиях между возбудителями в Липецкой области и Сочи. Для подтверждения этого предположения были исследованы антигенные взаимоотношения между штаммами вируса Добрава, выделенными нами от полевой мыши *A. agrarius* из Липецкой области (штамм Aa1854/Липецк-02) и от

Таблица 1

Сравнительный анализ клинических показателей ГЛПС, этиологически обусловленной подтипами вируса Добrava, %

Клинические проявления		Подтипы вируса*	
		DOBV-Aa	DOBV-Ap
Симптомы	Боль в животе	46	89
	Тошнота	44	89
	Рвота	27	72
	Диарея	11	50
	Кровоизлияния в склеры	2	50
	Кровотечения кишечные	1	11
	Увеличенная печень	23	83
	Желтуха	1	11
	Олигурия <500 мл/сут.	35	77
	Анурия <200 мл/сут.	8	39
	Полиурия	25	6
	Менингизм	1	6
Осложнения	Инфекционно-токсич. шок	1	6
	ДВС-синдром	1	11
	Отек легких	1	6
	Пневмония	4	0
	Смерть	0,9	6
Вариант течения	Типичное	84	6
	Безболевого	8	6
	Абдоминальное	7	88
Тяжесть течения	Легкая	19	6
	Средней тяжести	54	39
	Тяжелая	27	55

* DOBV-Aa – Липецк, 108 наблюдений; DOBV-Ap – Сочи, 18 наблюдений.

кавказской лесной мыши *A. ponticus* из Сочи (штамм Ap1584/Сочи-01).

В результате исследования хантавирусных штаммов в опытах перекрестного титрования сывороток крови больных в реакции нейтрализации было установлено 8-кратное превышение титров вирус-нейтрализующих антител с гомологичными штаммами вируса Добrava по сравнению с титрами антител, выявляемыми при испытании тех же сывороток со штаммами вирусов Хантаан и Сеул при полном отсутствии нейтрализации анти-Добrava сыворотками вируса Пуумала. В большинстве исследованных сывороток выявлены 4-кратные отличия в титрах нейтрализующих антител в сыворотках крови больных ГЛПС из Сочи и Липецка при их перекрестном титровании со штаммами Ap1584/Сочи-01 и Aa1854/Липецк-02 (табл. 2).

Генетическая характеристика вирусных изолятов. Полностью были секвенированы S- и M-сегменты обоих штаммов вируса Добrava. S-сегмент штамма Ap1584/Сочи-01, кодирующий нуклеокапсидный

Таблица 2

Серотипирование хантавирусных антител в реакции нейтрализации*

Сыворотки больных ГЛПС	Подтипы вируса Добrava		Хантаан	Сеул	Пуумала
	Ap1584, Сочи	Aa1854, Липецк			
Сочи-1310	2560	640	160	160	<40
Сочи-1312	2560	80	160	<40	<40
Сочи-3692	1280	160	40	<40	<40
Сочи-4708	5120	1280	320	80	<40
Сочи-4709	5120	1280	320	<40	<40
Сочи-4713	20480	5120	320	160	<40
Сочи-4714	20480	5120	320	320	<40
Сочи-4715	5120	2560	320	320	<40
Сочи-4716	5120	1280	160	<40	<40
Липецк-3894	40	640	<40	<40	<40
Липецк-3958	80	1280	160	<40	<40
Липецк-4327	160	640	40	40	<40
Липецк-4329	10240	20480	160	160	<40
Липецк-4330	80	320	<40	<40	<40
Липецк-4334	1280	5120	320	<40	<40
Липецк-4338	1280	5120	320	<40	<40
Липецк-4344	160	640	40	40	<40

* Титры антител выражены в величинах, обратных разведению сыворотки.

белок в 429 аминокислот (ак) с единственной рамкой считывания, составил в длину 1649 нуклеотидов (нт). S-сегмент штамма Aa1854/Липецк-02 оказался на 24 нп (нуклеотидные пары) длиннее. M-сегмент штамма Ap1584/Сочи-01 содержал 3 616 нп и кодировал предшественник гликопротеинов, содержащий 1133 аминокислоты. M-сегмент штамма Aa1854/Липецк-02 содержал 3 643 нп. У обоих штаммов секвенирован фрагмент L-сегмента длиной в 541 нт (109–649 нт). По результатам секвенирования выявлены значительные отличия между штаммами вируса Добrava из Сочи и Липецка (табл. 3). Наибольшее сходство штамма из Сочи выявлено со штаммом AP/Af19 вируса Добrava, выделенным от желтогорлой мыши в Греции, а также с РНК-изолятами, выделенными нами ранее из крови больной ГЛПС из Краснодара (P-s 1223/Краснодар-2000) и от кавказской лесной мыши (Ap-1/Горячий Ключ-2000) [23].

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей S-сегмента располагает на древе штамм Ap1584/Сочи-01, а также РНК-изоляты P-s1223/Краснодар-2000 (Af442623) и Ap-1/Горячий Ключ-2000 (Aa442622) отдельным кластером, который обозначен нами как геновариант DOBV-Ap (рис. 1, а). Примечательно, что в то время как геноварианты DOBV-Ap и DOBV-Af имеют общего предка на филогенетическом древе S-сегмента, по анализу

Таблица 3

Процент соответствия нуклеотидных и аминокислотных последовательностей
геновариантов вируса Добрава

Вирусные РНК-изоляты	Ap1584/Сочи-01				Aa1854/Липецк-02			
	S-сегмент		M-сегмент		S-сегмент		M-сегмент	
	HT	AK	HT	AK	HT	AK	HT	AK
Ap1584/Сочи-01	—	—	—	—	86,6	96,7	79,7	91,3
Aa1854/Липецк-02	86,6	96,7	79,7	91,3	—	—	—	—
SK/Aa	84,8	97,4	78,6	90,4	89,9	98,8	87,2	97,0
Slo/Af	87,8	97,6	79,3	93,3	88,5	96,7	82,7	94,0
AP/Af19	87,6	97,9	79,6	93,3	88,2	97,4	82,5	94,1
Saa/160V	84,4	96,2	78,3	90,2	87,5	96,0	86,3	96,2
Куркино/53Аа/98	86,6	96,7	—	—	98,8	99,5	—	—
Ap-1/Горячий Ключ-2000	96,8	98,8	—	—	87,3	96,5	—	—
P-s 1223/Краснодар-2000	98,7	99,4	—	—	86,5	96,4	—	—

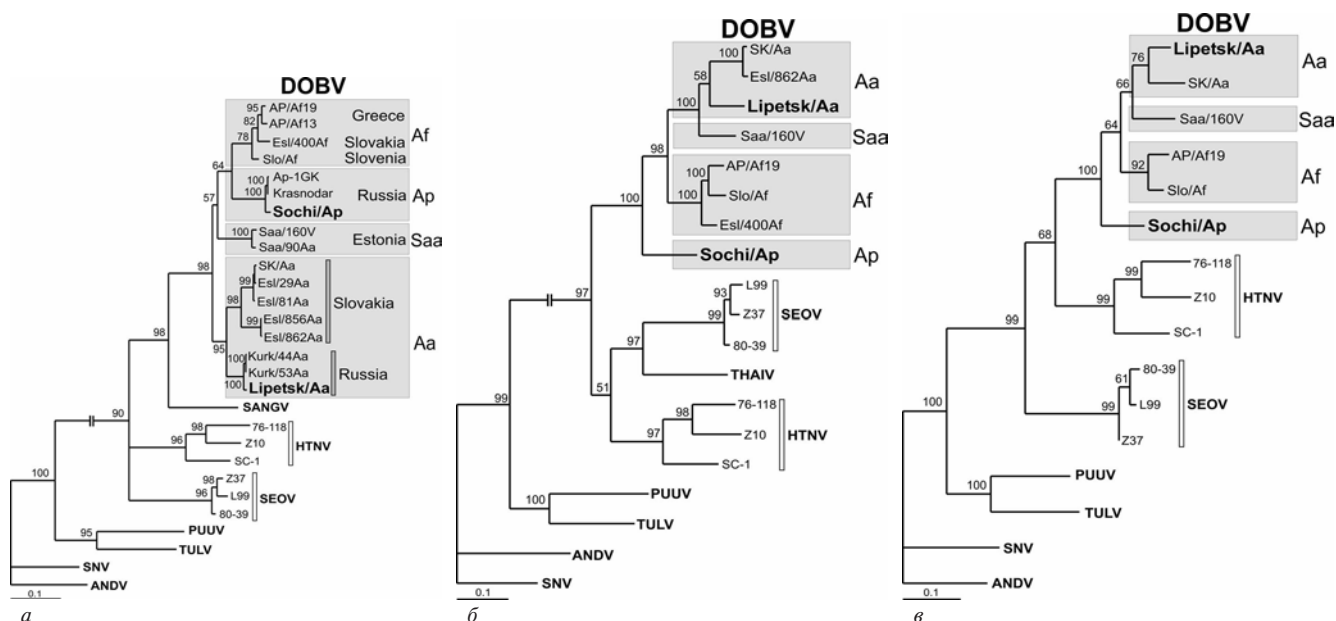


Рис. 1. Филогенетические взаимоотношения между геновариантами вируса Добрава и другими хантавирусами.

а — на основании сиквенса S-сегмента; б — на основании сиквенса M-сегмента; в — на основании сиквенса L-сегмента.

M- и L-сегментов штамм Ap1584/Сочи-01 выделяется из общего кластера вируса Добрава (рис. 1, б, в). Если исключить возможные процессы реассортации, другим объяснением этих противоречивых результатов могут быть недостаточные данные по сиквенсу (неполные сиквенсы РНК некоторых из сравниваемых изолятов).

Штамм Aa1854/Липецк-02 по сиквенсам всех трех сегментов определенно занимает место в клейде DOBV-Aa, образуя отдельную ветвь с изолятами от полевой мыши из Куркино, Тульской области (рис.1).

В результате комплексных клинико-эпидемиологических, иммунологических и молекулярно-генетических исследований была установлена циркуляция в районе Сочи нового подвида вируса Добрава DOBV-Ap, основным хозяином которого и источником заражения людей является кавказская лесная мышь

A. ponticus. Вызванные этим вирусом заболевания у людей имели определенные отличия клинических проявлений и характеризовались более тяжелым течением, чем заболевания ГЛПС у жителей центральных областей России, этиологически обусловленные подвидом DOBV-Aa.

Первые случаи заболевания, сходного по клинике с ГЛПС, были зарегистрированы в Краснодарском крае в 1966 и в 1971 г. [1, 3]. Поскольку в то время еще отсутствовали методы специфической диагностики ГЛПС (вирус-возбудитель был открыт в 1976 г.), о правильности клинических диагнозов, очевидно, следует говорить с определенной осторожностью. Однако в начале 1980-х годов в результате лабораторного исследования органов мелких млекопитающих и крови здорового населения была показана циркуляция хантавирусов среди мелких млекопитающих

и существование природных очагов ГЛПС на территории Краснодарского края [4]. Подтверждением этому служит выявление в 2000 г. случая острого тяжелого заболевания ГЛПС, этиологически связанного с вирусом Добрава [23]. Проведенное нами исследование позволило описать ежегодную спорадическую заболеваемость ГЛПС на территории субтропической зоны Краснодарского края. Ранее эта территория не считалась эндемичной по данной инфекции, и полученные данные представляют ценную информацию для органов местного здравоохранения.

Более тяжелое клиническое течение ГЛПС у больных из Сочи можно объяснить, по-видимому, более высокой вирулентностью подвида DOBV-Ap. В целом случаи ГЛПС в центральной России, вызванные подвидом DOBV-Aa, по тяжести клинического течения не имели существенных отличий от заболеваний, этиологически обусловленных вирусом Пуумала [5]. Вместе с тем показаны значительные отличия в эпидемиологии этих заболеваний [6].

Отсутствие должного опыта у клиницистов в отношении редко встречающейся прежде болезни вызвало значительные трудности дифференциальной диагностики. Окончательный клинический диагноз ГЛПС в подавляющем большинстве случаев выставлялся лишь после специфической лабораторной диагностики.

Очевидно, циркуляция вируса Добрава в популяции некоторых видов мышей рода *Apodemus* носит повсеместный характер, хотя окончательный вывод об ареале этого вируса и вызываемых им нозологических формах можно будет сделать лишь после проведения соответствующих исследований на большинстве административных территорий России.

В связи с вышеизложенным проблема заболеваемости ГЛПС, вызванной новым для европейских очагов России вирусом Добрава, приобретает особую важность для здравоохранения в плане проведения эффективной диагностики, лечения и профилактики этой инфекции.

Литература

1. Агапова Е.Н., Мултых Е.В., Цинкаловский И.В. // *Вопр. вирусол., эпидемиол. и клин. инфекционных болезней*. — Краснодар, 1968. — С. 243–249.
2. Апекина Н.С., Мясников Ю.А., Бобылкова Т.В. и др. // *Актуальные аспекты природно-очаговых болезней*. — Омск, 2001. — С. 84–85.
3. Горькова Т.И., Шамак Д.Р. // *Клин. мед.* — 1973. — Т. 1. — С. 137–138.
4. Дранов И.Ю., Тинкер Ю.А., Ткаченко Е.А. и др. // *Актуальные пробл. мед. вирусологии*. — М., 1985. — С. 138–139.
5. Морозов В.Г., Ткаченко Е.А., Рошупкин В.И. и др. // *Мед. вирусол.* — 2006. — Т. 23. — С. 230–236.
6. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К. и др. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. — 2005. — Т. 4, № 23. — С. 28–34.
7. Ткаченко Е.А., Окулова Н.М., Морзунов С.П. и др. // *Вопр. вирусол.* — 2005. — № 3. — С. 14–19.
8. Avsic-Zupanc T., Xiao S.Y., Stojanovic R. et al. // *J. Med. Virol.* — 1992. — Vol. 38. — P. 132–137.
9. Klempa B., Schmidt H.A., Ulrich R. et al. // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77. — P. 804–809.
10. Klempa B., Schutt M., Auste B. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — Vol. 42. — P. 1322–1325.
11. Klempa B., Stanko M., Labuda M. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — Vol. 43. — P. 2756–2763.
12. Kruger D.H., Ulrich R., Lundkvist A. // *Microbes Infect.* — 2001. — Vol. 3. — P. 1129–1144.
13. Lee P.W., Gibbs C.J., Gajdusek C. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1985. — Vol. 22, No. 6. — P. 940–944.
14. Lundkvist A., Apekina N., Myasnikov Y. et al. // *Lancet.* — 1997. — Vol. 350. — P. 781–782.
15. Nemirov K., Vapalahti O., Lundkvist A. et al. // *J. Gen. Virol.* — 1999. — Vol. 80. — P. 371–379.
16. Plyusnin A., Vaheri A., Lundkvist A. // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44, N 4. — P. 1608–1609.
17. Schmidt H.A., Strimmer K., Vingron M. et al. // *Bioinformatics.* — 2002. — Vol. 18. — P. 502–504.
18. Schutt M., Gerke P., Meisel H. et al. // *Clin. Nephrol.* — 2001. — Vol. 55. — P. 371–374.
19. Sibold C., Ulrich R., Labuda M. et al. // *J. Med. Virol.* — 2001. — Vol. 63. — P. 158–167.
20. Swofford D.L. *PAUP (Phylogenetic analysis using parsimony), version 4*. — Sunderland : MA. — USA, 2002.
21. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // *Nucl. Acids. Res.* — 1994. — Vol. 22. — P. 4673–4680.
22. Tkachenko E., Bashkirtsev V., van der Groen G. et al. // *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* — 1984. — Vol. 64. — P. 425–426.
23. Tkachenko E., Dzagurova T., Dekonenko A. et al. // *Intern. Conf. on Emerging Infect. Dis. : abstracts*. — Atlanta, USA, 2002. — P. 14.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

SPECIFIC FEATURES OF THE HAEMORRHAGIC FEVER WITH NEPHRITIC SYNDROME, CAUSED BY GENETIC SUBTYPES OF VIRUS DOBRAVA/ BELGRAD IN RUSSIA

E.A. Tkachenko¹, T.K. Dzagurova¹, V.G. Morozov², Yu.V. Junicheva³, G.P. Slyusareva⁴, N.S. Sedova¹, A.A. Smirnov¹, N.A. Korotina¹, B. Klempa⁵, D. Kryuger⁵

¹ Institute of a poliomyelitis and virus encephalitis named by M.P. Chumakov of Russian Academy of Medical Science (Moscow region), ² Samara military medical institute, ³ Sochi antiplague branch of the Prichernomorskaya station Rospotrebnadzor, ⁴ Lipetsk city hospital, ⁵ Institute of virology (Berlin, Germany)

Summary — As a result of complex clinical, epidemiological, immune and molecular-genetic researches circulation in area Sochi of new subspecies of virus Dobrava DOBV-Ap which basic owner and a source of infection of people is Caucasian wood mouse *Apodemus ponticus* has been found. The diseases caused by these virus at people had the certain differences of clinical signs were more severe than of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome at inhabitants of the central areas of Russia, caused by subspecies DOBV-Aa.

Key words: the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, virus Dobrava, Sochi, Lipetsk area.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-092

В.А. Иванис

Владивостокский государственный медицинский университет

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Ключевые слова: хантавирусная инфекция, цитокины, иммунопатогенез.

Хантавирусная инфекция известна двумя нозоформами — геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и хантавирусный кардиолегочный синдром. Приведены данные литературы и собственных исследований в пользу вирусно-иммунологической концепции патогенеза хантавирусной инфекции. Развитие реакций иммунного воспаления обуславливает гемодинамические нарушения в органах-мишенях. Сбалансированность Т-клеточных эффектов при легких и среднетяжелых формах заболевания ведет к благоприятному течению и самолимитации инфекции. Глубокий структурный дисбаланс цитокинов и клеточного звена иммунитета приводит к формированию полиорганной недостаточности, тяжелым клиническим проявлениям и возможности неблагоприятного исхода.

Актуальность хантавирусной инфекции определяется ежегодным ростом заболеваемости в мире с расширением ареала природных очагов, часто тяжелым течением болезни, высоким уровнем летальности и социально-экономической значимости [7, 8, 18, 25, 29]. К настоящему времени различают две нозоформы хантавирусной инфекции — геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), хорошо известная в странах евразийского континента, в том числе и на территории России, и хантавирусный кардиолегочный синдром (ХКЛС), регистрируемый в странах Северной и Южной Америки — США, Канаде, Панаме, Аргентине, Перу, Мексике, Бразилии. Единая этиология этих заболеваний была установлена около 15 лет назад. Каждая нозоформа ассоциирована с определенными серотипами/генотипами хантавируса, резервуарами которых в природе являются разные виды мышевидных грызунов, обитающих в отдельных ландшафтных зонах мира [8, 18].

Большая часть Приморского края является активным природным очагом ГЛПС, где циркулируют три серотипа хантавируса (Хантаан, Амур, Сеул), а заболевание у человека характеризуется нередко тяжелым и атипичным течением болезни и высокой (1,2–7,8%) летальностью. ХКЛС (серотипы Син-Номбре, Андес) в крае не регистрируется [3, 4, 8].

Данные литературы последнего десятилетия показали, что механизмы патогенеза и патоморфологии органов-мишеней (легкие, миокард, почки, печень) обеих форм инфекции, ассоциированной с разными хантавирусами, имеют общий иммунопосредованный характер. Ключевым моментом начала инфекционного процесса принято считать не авторитарную роль вируса, а инициацию им иммунного ответа, играющего критическую роль в активации эндотелиальных клеток, развитии сосудистых дисфункций и, как следствие, деструктивных процессов в

тканях и полиорганной недостаточности. В результате серии экспериментальных исследований выяснено, что хантавирус обладает уникальным свойством реплицироваться в различных клетках, не повреждая их. При этом ярко выраженные нарушения сосудисто-тканевой проницаемости возникают без видимого цитопатического эффекта с наличием внутриклеточно реплицирующихся патогенных хантавирусов Пуумала, Добрава, Хантаан, Сеул, Син-Номбре, Андес. Это свидетельствует о неспособности хантавируса к прямому цитопатогенному эффекту и инициации некроза тканей [11, 20, 26].

Иммунный ответ: органы и клетки-мишени хантавируса. Современные представления о патогенезе хантавирусной инфекции складываются из респираторного пути проникновения, вирусемии и диссеминации, репликации в клетках дыхательных путей, эндотелиоцитах сосудов микроциркуляторного русла и тканях органов-мишеней (легкие, почки, печень), развития системного и локального иммунного воспаления с инициацией высокой сосудистой проницаемости и плазмореи (massive capillary leak), гипергидратации тканей, синдрома диссеминированного сосудистого свертывания крови и полиорганной недостаточности. Респираторный путь проникновения хантавируса обуславливает раннее участие в иммунном ответе клеток бронхолегочной системы и крови — эндотелия сосудов, альвеолярных макрофагов, тучных клеток, полиморфно-ядерных лейкоцитов, эозинофилов, тромбоцитов, лимфоцитов, — дренирующих место внедрения инфекции. Эти клетки, являясь элементами иммунной системы, оказывают влияние на регуляцию сосудистого тонуса, функционирование системы микроциркуляции [9, 16, 26]. Продолжительная вирусемия (5–15 дней) и диссеминация хантавируса обуславливают внутриклеточное инфицирование и его репликацию в широком спектре клеток, ключевыми из которых выступают эндотелиоциты, тромбоциты и макрофаги. Обширная поверхность эндотелиальной выстилки представляет собой «полигон» формирования иммунного ответа, следствием которого является универсальная деструкция эндотелиальных клеток, обеспечивающая разнообразную органную патологию [9, 20, 24, 26]. Тромбоциты и макрофаги, будучи мишенями хантавируса, играют также ведущую роль в иммунном ответе в качестве эффекторных клеток, источников цитокинов, компонентов комплемента и оксида азота. Наши исследования метаболитов оксида азота в трех биологических средах (сыворотке крови, моче и конденсате выдыхаемого воздуха) в раннюю

(до 7 дня) стадию ГЛПС показали высокие значения их в моче и выдыхаемом воздухе, коррелировавшие с изменением некоторых клинико-биохимических параметров почек и легких. Следовательно, респираторный тракт и почки у больных ГЛПС являются регионами избирательно повышенного синтеза оксида азота, что свидетельствует о его вероятном вкладе в патофизиологические процессы в органах-мишенях — плазморею, интерстициальный отек и резкие нарушения микроциркуляции. Прямая взаимосвязь цитолитических процессов в печени и высокого содержания метаболитов оксида азота в моче может косвенно свидетельствовать о значении нитрооксида в развитие патологии печени у больных ГЛПС. Локальную заинтересованность в продукции нитрооксида, вероятно, проявляют и многочисленные эффекторные клетки (нейтрофилы, тромбоциты), синтезирующие оксид азота в больших количествах под влиянием провоспалительных цитокинов. Очевидно, высокие локальные концентрации этого соединения оказывают мощное провоспалительное и цитотоксическое действие [3, 6, 8].

В презентации антигена показано ведущее значение дендритных клеток и инфицированных моноцитов, трансформирующихся в дендритные клетки, которые способны инфицировать другие иммунocyты и стимулировать диспропорцию иммунного ответа [17, 20, 25]. Серией работ последнего десятилетия показано, что клеточный вход патогенных хантавирусов опосредован β_3 -интегринами (гетеродимерными α_v - и β -рецепторами клеток, молекулами межклеточных контактов на поверхности лимфоцитов), факторами, способствующими адгезивности эндотелия и агрегации тромбоцитов [2, 12]. Блокада патогенными хантавирусами HTN- и SNV-рецепторов β_3 -интегринов инициирует иммунный ответ, дестабилизирует проницаемость сосудистой стенки, усиливает процесс капиллярной «протечки» [2, 12, 20, 21].

Иммунный ответ: роль цитокинов. Центральная роль в регуляции иммунного ответа и его интеграции с функциями всех систем организма принадлежит цитокинам — медиаторам межклеточных взаимосвязей, обладающим каскадным действием в рамках единой регуляторной сети. Известно, что внутриклеточный паразитизм вируса обеспечивает преимущественно Т-хелпер-1-зависимый клеточный ответ, при котором спектр продуцируемых цитокинов включает γ -интерферон, фактор некроза опухоли- α и интерлейкин-2. Основой этого ответа является деструкция и гибель клетки со всем ее содержимым, включая инфекционный агент (цитотоксический эффекторный ответ), что свойственно острым саморазрешающимся инфекциям. Напротив, Т-хелпер-2-зависимый ответ характеризуется преимущественной продукцией интерлейкинов 4 и 10 и специфических антител, инициируя реакции гуморального иммунитета. Для «гладкого» течения инфекции важно сохранение равновесия оппозиционных пулов цитокинов [9].

Сосудистый эндотелий — важнейший метаболический компонент, обеспечивающий контроль гомеостаза и сосудисто-тканевой проницаемости, — является мишенью не только хантавируса, но и многих цитокинов, а для ранних макрофагальных цитокинов (фактор некроза опухоли- α , γ -интерферон, интерлейкин-1 α) одновременно и их источником [24, 29]. События иммунного ответа, развертывающиеся в эндотелиальных клетках, обуславливают дальнейшие органые поражения. Несбалансированная цитокинемия служит ключевым фактором внутрисосудистой активации, индукции системных эффектов, проявляющихся urgentными состояниями [1, 3, 6, 10, 11, 13, 14, 16]. Результаты анализа цитокинового статуса при ХКЛС, ассоциированном с серотипами Син-Номбре и Андес, демонстрируют ранний агрессивный провоспалительный иммунный ответ (Т-хелпер-1-зависимый), когда высокие уровни фактора некроза опухоли- α , γ -интерферона, интерлейкинов 6 и 12 коррелировали с выраженностью гемоконцентрации, с гипотонией и с неблагоприятным прогнозом инфекции [11, 26, 28, 29, 30]. Наши исследования у больных ГЛПС, обусловленной серотипами Хантаан, Сеул и Амур, выявили ту же тенденцию изменений цитокинового статуса: в раннюю фазу болезни (до 10-го дня) — гиперактивация одних цитокинов (фактора некроза опухоли- α , интерлейкинов 4, 10, 1 α и 12p70) и снижение активности других (γ -интерферона и интерлейкина-2), позже — разнообразные варианты их продукции [8]. Высокие уровни сывороточных провоспалительных цитокинов — фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-1 α , — которые продуцируются клетками моноцитарно-макрофагальной системы, эндотелиоцитами, NK-клетками и нейтрофилами, инициировали широкий спектр синергичных биологических эффектов, характерных для ранней фазы ГЛПС и сопряженных с частотой регистрации шока, геморрагического и респираторного синдромов. Это — увеличение проницаемости клеточных мембран, повышение адгезивности эндотелия, цитолиз инфицированных клеток, капиллярная «протечка» (плазморея), трансэндотелиальная миграция лейкоцитов в ткани. Корреляция высоких концентраций фактора некроза опухоли- α с частотой и тяжестью ведущих клинических проявлений ГЛПС позволила согласиться с многочисленными авторами, считающими уровень этого цитокина критерием тяжести и прогноза инфекции [1, 10, 19, 22].

Анализ содержания противовоспалительных интерлейкинов 4 и 10 в сыворотке крови выявил общую тенденцию в динамике ГЛПС — увеличение их концентраций параллельно сроку болезни: в ранние сроки болезни — в 2 раза, на 3–4-й неделе — в 4 и более раз. Полученные результаты позволяют предполагать раннюю активизацию этих цитокинов как гарантию более легкого течения болезни, своеобразную защитную реакцию иммунной системы в ответ на «провоспалительную гиперцитокинемию», гиперфункцию эндотелиальных клеток и моноцитов/макрофагов [3, 19].

Степень выраженности всех сдвигов цитокинового статуса соответствовала тяжести ГЛПС и зависела от этиологического агента. Более вирулентные серотипы вируса (Хантаан, Амур), инициирующие глубокий дисбаланс медиаторов иммунного ответа, обеспечивали и более тяжелое течение инфекции, чем серотип Сеул. Следует учитывать и возможный феномен мимикрии вируса, гены которого способны кодировать гены отдельных цитокинов и влиять на природу иммунного ответа для облегчения своей репликации [9].

Большое значение придают локальной экспрессии фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-1 α , например, в почках при формировании тяжелого тубулоинтерстициального нефрита [28, 30], а также в легких и селезенке [14, 21, 22]. Наши результаты исследования альтернативных цитокинов (интерлейкины 4, 10 и 12, γ -интерферон) в моче и в конденсате выдыхаемого воздуха установили самостоятельный и независимый их синтез, интенсивность которого коррелировала с частотой ведущих синдромов болезни [3, 6, 8]. Это позволяет считать эндотелий почек и легочных капилляров, а возможно, и альвеолиты легких местами усиленной локальной продукции медиаторов иммунного ответа. В целом результаты изучения цитокинового статуса у больных хантавирусной инфекцией разной этиологии свидетельствуют о значительной роли клеточных иммунных нарушений в инициации ведущих патофизиологических сдвигов в различные сроки болезни. Следует предположить, что обнаруженный нами ранний Т-хелпер-2-тип иммунного ответа может играть модулирующую и защитную роль при легких и среднетяжелых формах болезни, снижая агрессивность вируса и цитотоксичность ответа Т-хелперов 1-го типа. Судя по сдвигам цитокинового статуса, у больных легкими формами ГЛПС адаптивные и сбалансированные иммунные реакции возникают чаще, обеспечивая благоприятный прогноз.

Известны традиционные причины тяжелого течения и неблагоприятных исходов болезни — вирулентность хантавируса и массивность инфицирования, обуславливающие высоту вирусной нагрузки. При хантавирусной инфекции, кроме этих факторов, огромное значение имеет характер иммунного ответа организма. При тяжелых формах основную патогенетическую роль играет выработка активированными эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов, уровень которых повышается в 8–14 раз, а их прямые и опосредованные эффекты приводят к усилению проницаемости эндотелия, плазмореи и гипергидратации тканей органов-мишеней [23, 26]. Уже на ранней стадии при тяжелых формах ГЛПС имеются функциональные признаки депрессии Т-лимфоцитов (снижение уровней γ -интерферона, интерлейкинов 2 и 4), то есть активности обеих популяций Т-хелперов, что приводит к подавлению защитных реакций клеточного иммунитета. Опреде-

ленный вклад в этот процесс вносят моноциты/макрофаги, что подтверждается увеличением синтеза интерлейкина-12, который должен активировать выработку Т-хелперами 1-го типа и CD8-лимфоцитами γ -интерферона. Но, очевидно, степень активации макрофагов недостаточная, что может быть следствием активной репликации вируса в макрофагах и повреждением их белоксинтезирующих органелл [3, 5]. Изменения цитокинового статуса у больных ГЛПС, ассоциированной с разными серотипами вируса, отражали однотипные тенденции иммунного ответа, однако степень и глубина нарушений были более значительными при инфекции, вызванной более вирулентными вирусами Хантаан и Амур.

Иммунный ответ: Т-лимфоциты. Известно, что РНК хантавируса — мощный стимулятор активации клеток первой линии иммунной защиты, в том числе Т-лимфоцитов, играющих важную роль в патогенезе инфекции и элиминации возбудителя. Нуклеокапсидный белок хантавирусов разных серотипов служит прямой мишенью CD8-клеток, поликлональная экспрессия является главным механизмом патогенеза ранних фаз инфекции [5, 23]. В разгар ГЛПС повышение количества лимфоцитов CD8⁺ и CD16⁺ регистрируется в сыворотке крови, в плевральном выпоте, тканях легких и почек у больных ХКЛС [19, 20, 22, 23]. Исследования клеточного иммунитета, предпринятые нами в ранние сроки (до 10 дня болезни) ГЛПС, выявили статистически достоверное снижение численности общей популяции лимфоцитов (CD3⁺), причем за счет Т-хелперов (CD4⁺), коррелирующее с низким уровнем γ -интерферона, что означает нарушения в активации клеточного иммунного ответа [3, 6, 8].

Наиболее вероятная причина недостатка CD4-клеток связана с эффекторными функциями цитотоксических лимфоцитов CD8⁺ и NK-клеток в отношении инфицированных CD4-лимфоцитов. Повышение уровней клеток CD8⁺ связывают и с инициацией другой программы гибели клетки — апоптоза, который играет ключевую роль в механизмах цитолиза инфицированных клеток, а следовательно, в ограничении и замедлении распространения вируса, а также в его элиминации [15, 20, 27]. Обнаружены одинаковые механизмы индукции апоптоза вирусами Хантаан и Андес: активация каспаз, освобождение апоптотических факторов из митохондрий инфицированных клеток, снижение концентрации компонентов экстрацеллюлярного матрикса, ответственного за регуляцию жизнеспособности клеток. Публикации последнего времени показывают, что в экспериментах с использованием эмбриональных почечных клеток имеет место внутренний (митохондриальный) путь апоптоза инфицированных клеток (повышение уровней каспаз 3 и 9) только при инфекции, ассоциированной с высокопатогенными хантавирусами Андес и Хантаан [15, 27, 29]. Заслуживает внимания содержание

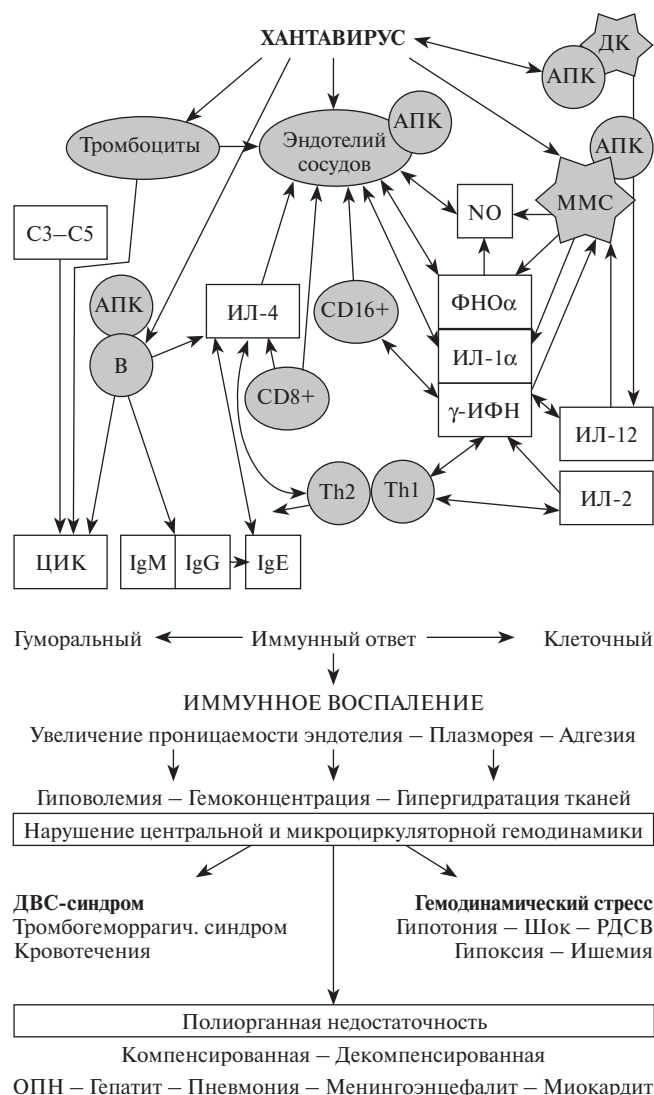


Рис. Схема иммунопатогенеза ГЛПС.

АПК – антиген-презентирующие клетки; В – В-лимфоцит; ДК – дендритные клетки; ИЛ – интерлейкин; ИФН – интерферон; ММС – моноцитарно-макрофагальная система; ОПН – острая почечная недостаточность; РДСВ – респираторный дистресс-синдром взрослых; Th – Т-лимфоциты-хелперы; ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы.

CD95 – маркера клеточно-автономного апоптоза активированных Т-лимфоцитов. Отмечено снижение числа CD95-клеток в группе больных с тяжелыми и осложненными формами Пуумала-инфекции в отличие от их повышенного содержания в группе больных с «гладким» течением [1]. Важно отметить, что по результатам ряда экспериментальных работ полученная реакция Т-лимфоцитов практически не отличалась у больных хантавирусной инфекцией, ассоциированной с разными серотипами вируса – Син-Номбре, Хантаан, Пуумала [20]. Наши исследования CD95-клеток в раннюю стадию ГЛПС показали достоверно усиленные процессы апоптоза, увеличение относительного количества клеток CD95+ в 2 раза, а при тяжелых формах Хантаан и Амур-инфекции – в 5 раз. Вероятно, апоптозу подвергается большое количество активированных

лимфоцитов после выполнения своих функций, чем в большей мере и объясняется характерная динамика гемограммы у больных ГЛПС, замеченная многими клиницистами: лимфопения, нарастание сдвига нейтрофилов до миелоцитов.

Иммунный ответ: роль циркулирующих иммунных комплексов. Установлено, что динамика образования специфических антител и иммунных комплексов у больных ГЛПС – закономерный процесс естественной иммунологической реакции организма. Качественная (размеры) и количественная характеристика циркулирующих иммунных комплексов достоверно зависели от срока болезни, высоты вирусной нагрузки, степени тяжести поражения органов. Содержание в составе циркулирующих иммунных комплексов хантавирусной РНК в ранний период болезни определялось у больных тяжелыми и среднетяжелыми формами инфекции, причем частота ее обнаружения не уменьшалась, а увеличивалась к периоду реконвалесценции, что позволяет считать циркуляцию иммунных комплексов скорее защитным фактором иммунитета, чем повреждающим, направленным на элиминацию возбудителя [4]. Предполагается и значение гиперцитокинемии фактора некроза опухоли-α, уменьшающей экспрессию рецепторов адгезии эндотелиоцитов и препятствующей осаждению циркулирующих иммунных комплексов с развитием иммунокомплексной патологии, что и ранее отрицалось ведущими исследователями ГЛПС [7].

Таким образом, основой патогенеза хантавирусной инфекции следует считать вирусно-иммунологическую концепцию (рис.). Значение вирусного начала инфекции (геновариант, вирулентность, количество) не подлежит сомнению. Однако вирусная инициатива опосредуется иммунным ответом макроорганизма. Развитие реакций иммунного воспаления обуславливает центральные и микроциркуляторные гемодинамические нарушения – гиповолемию, гемоконцентрацию, гипергидратацию тканей и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, преимущественно в органах-мишенях (респираторный тракт, почки, мозг, печень). Сбалансированность Т-клеточных эффектов при легких и среднетяжелых формах ГЛПС ведет к благоприятному течению и самолимитации инфекции. Глубокий структурный дисбаланс цитокинов и клеточного звена иммунитета приводит к формированию полиорганной недостаточности, тяжелым клиническим проявлениям и возможности неблагоприятного исхода.

Литература

1. Валишин Д.А., Сахаутдинова Т.В., Мамон А.П., Сибиряк С.В. // Пятый Рос. съезд врачей-инфекционистов : тез. докл. – М., 1998. – С. 52–53.
2. Гавриловская И.Н. // Актуальные проблемы мед. вирусологии : мат. науч. конф., посвящ. 90-летию со дня рожд. М.П. Чумакова. – М., 1999. – С. 58.

3. Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника, иммуно-корректирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом в регионе циркуляции разных серотипов хантавируса: дис. ... д-ра мед. наук. — Владивосток, 2004.
4. Максема И.Г., Кушнарева Т.В., Слонова Р.А., Иванис В.А. // Тихоокеанский мед. журнал. — 2006. — № 4. — С. 35–38.
5. Мурзабаева Р.Т. Система интерферона и иммунный статус у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2003.
6. Перевертень Л.Ю. Состояние местной и системной иммунной защиты при геморрагической лихорадке с почечным синдромом, обусловленной хантавирусом «Сеул» : автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Владивосток, 2005.
7. Сиротин Б.З. Очерки изучения геморрагической лихорадки с почечным синдромом. — Хабаровск : РИ-ОТИП, 2005.
8. Слонова Р.А., Ткаченко Е.А., Иванис В.А., Компанец Г.Г. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2006.
9. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1. — № 2. — С. 17.
10. Ющук Н.Д., Валишин Д.А., Сахаутдинова Г.В., Сибиряк С.В. // Эпидемиол. и инфекционные болезни. — 1999. — № 4. — С. 36–37.
11. Borges A.A., Campos G.M., Moreli M.Z. et al. // 7th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Buenos Aires, Argentina, 2007. — P. 87.
12. Buranda T., Wu Y., Acuna-Retamar M. et al. // 7th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Buenos Aires, Argentina, 2007. — P. 189.
13. Cebalo L., Marconic A., Schmaljon C. // 6th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Seoul (Korea), 2004. — P. 86.
14. Ennis F.A. // Factors in the Emergence and Control of Rodent — born Viral Diseases. — Paris, 1999. — P. 132–138.
15. Jankoviae M., Bego M., Cebalo L. // 7th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Buenos Aires, Argentina, 2007. — P. 76.
16. Khaiboullina S.F., Levis S., Enria D., Jeor S. // 5th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses. Abstract Book. — Annecy (France), 2001. — P. 111.
17. Kraus A.A., Raftery M.J., Giese T., Ulrich R. et al. // 6th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Seoul (Korea), 2004. — P. 43.
18. Lee H.W. // Хантавирусы и хантавирусные инфекции / под ред. Р.А. Слоновой, В.А. Иванис. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2003. — С. 20–41.
19. Linderholm M., Ahlm C., Settergren B., Waage A. // J. Infect. Dis. — 1996. — Vol. 173, No. 1. — P. 38–43.
20. Marcotic A., Rabatic S., Gargo A., Sabioncello A. // Factors in the Emergence and Control of Rodent-born Viral Diseases. — Paris, 1999. — P. 125–131.
21. Martines V.P., Maidana S. S., Padula P.J. // 7th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Buenos Aires, Argentina, 2007. — P. 196.
22. Mertzi G.J., Hjelle B.L., Williams T.M., Koster F.T. // Factors in the Emergence and Control of Rodent-born Viral Diseases. — Paris, 1999. — P. 133–135.
23. Padula P.J. // 7th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Buenos Aires, Argentina, 2007. — P. 78.
24. Penciero M.N., Sharefkin J.B., Dieffenbach C.W., Hay J. // J. Virol. — 1992. — Vol. 66. — P. 5929–5936.
25. Schönrich G. // 7th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Buenos Aires, Argentina, 2007. — P. 192.
26. Schountz T., Prescott J., Oko L. // 7th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Buenos Aires, Argentina, 2007. — P. 199.
27. Strandin T., Herojoki J., Hao W. // 7th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Buenos Aires, Argentina, 2007. — P. 200.
28. Temonen M., Mustonen J., Helin H. // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1996. — Vol. 78, No. 1. — P. 47–55.
29. Vaheri A., Li X.D., Kukkonen S., Plushin A. // 6th Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. — Seoul (Korea), 2004. — P. 21.
30. Zaki S.R., Nolte K.B. // Manual of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Hantavirus Pulmonary Syndrome. — Seoul, 1999. — P. 143–154.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

MODERN REPRESENTATIONS ABOUT THE PATHOGENESIS OF THE HANTAVIRAL INFECTION

V.A.Ivanis

Vladivostok state medical university

Summary — Hantavirus infection is known to two forms - hemorrhagic fever with nephritic syndrome and Hantavirus cardiopulmonary syndrome. The given literatures and own researches for the benefit of viral-immune concepts of the pathogenesis of the Hantavirus infection are resulted. The development of reactions of an immune inflammation causes hemodynamic changes in target-organs. Equation of T-cellular effects at easy and moderate forms of disease is favorable for healing. Deep structural dysbalance in cytokines and a cellular immunity results in formation of multiorgan insufficiency, severe clinical signs and an opportunity of an unsuccessful outcome.

Key words: Hantavirus infection, cytokines, immune pathogenesis.

УДК 578.833.29(571.1)

В.В. Якименко¹, С.Б. Гаранина², М.Г. Малькова¹, А.В. Валицкая³, Г.А. Константинова³, А.К. Танцев¹, С.В. Лучко¹, А.А. Матущенко¹, Д.О. Ирбаев⁴, А.Е. Платонов², Г.А. Шипулин²

¹ Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, ² Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва), ³ Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области (г. Тюмень),

⁴ Павлодарский педагогический университет

ИТОГИ ИЗУЧЕНИЯ ХАНТАВИРУСОВ В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Ключевые слова: хантавирусы, генотип, геновариант, эпизоотический процесс.

Дана характеристика природных очагов хантавирусных инфекций, связанных с вирусами четырех генотипов (Топографов, Пуумала, Добrava/Белград и Тула), циркулирующих в экосистемах различных ландшафтных зон в трех областях Западной Сибири. Распределение природных очагов всех четырех групп возбудителей имеет выраженный мозаичный характер. Арктические хантавирусы генотипа Топографов ассоциированы с сибирским леммингом на географически удаленных территориях. В Западной Сибири вирусы Пуумала представлены геновариантом, связанным с популяциями рыжей и красно-серой полевых. Природные очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом, ассоциированные с хантавирусами Добrava/Белград, приурочены к лесной зоне региона, связаны с популяциями полевой мыши и территориально перекрываются с очагами хантавируса Пуумала. Генотип Тула представлен двумя геновариантами, связанными с узкочерепной полевой и степной пеструшкой. Активность эпизоотического процесса в природных очагах хантавирусов обусловлена особенностями экологии хозяев.

Первоначальное представление о распространении геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в России основывалось на наличии дизъюнкции ареала этой инфекции в Сибири [5]. Однако в дальнейшем периодические попытки поиска «вируса ГЛПС» (прежнее название хантавирусов до установления факта их антигенной и генетической вариативности) на территории Западной Сибири, оказались успешными [1, 8, 9]. В данном сообщении приводится характеристика природных очагов хантавирусов четырех генотипов (Топографов, Пуумала, Добrava/Белград и Тула), циркулирующих в экосистемах различных ландшафтных зон Западной Сибири (северные субарктические тундры, подтайга и степь).

За указанный период обследовано 18030 мышевидных млекопитающих, отловленных на территориях всех ландшафтных зон Западной Сибири — от северных субарктических тундр Ямала и переходных тундр юго-западного Таймыра на севере до степей на юге Западной Сибири, от западных территорий Тюменской области и Ямало-Ненецкого А.О. до р. Обь на юго-востоке и до верховьев рек Пур и Таз на северо-востоке. Зоологические данные по млекопитающим Тюменской области (архивные данные Центра гигиены и эпидемиологии в Тюменской обл.) получены от канд. биол. наук А.П. Зуевского. Материалы с территории Новосибирской области собраны по просьбе авторов сотрудниками Института систематики и экологии животных СО РАН, канд. биол. наук

А.К. Доброворским и Центра гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области Е.М. Федоровым.

Отлов животных проводили при линейных учетах с помощью плашек Геро или при линейных учетах и учетах на площадках с помощью живоловок. Скрининг первичного материала (10–20% суспензии легких) проводили с помощью иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «Хантагност» (НПО ИПВЭ РАМН, г. Москва). Материал до исследования хранили при -196°C , после скрининга до проведения последующих исследований — при температуре ниже -72°C . Выделение тотальной РНК проводили с помощью реагента Trizol (GibcoBRL) или по протоколу «Рибозоль-100» (ЦНИЭ Роспотребнадзора) из антигеноположительных в иммуноферментном анализе 10% суспензий легочной ткани мелких млекопитающих. Полученную РНК исследовали в полимеразно-цепной реакции с наборами родоспецифических праймеров. Использовали комбинации праймеров, комплементарных различным участкам малого (S) и среднего (M) сегментов генома хантавирусов. С 2005 г. здесь применяли мультиплексную тест-систему [2]. Полученные РНК-изолаты идентифицировали методом прямого секвенирования.

Выравнивание полученных последовательностей осуществляли средствами ClustalX 1.81. Вычисление величин эволюционных дистанций, уровней гомологии, дендрограмм проводили в программах Mega 4 и Bioedit 7.0.9.0. Коды доступа в базе данных GenBank и принятые на рисунках сокращения хантавирусных последовательностей, используемых при расчете дендрограмм и расстояний, приведены ниже.

Генотип Пуумала. S-сегмент: AB010131, AJ223369 (444Cg/88/Udmurtia), AJ223375, AJ223377, AJ223380, AJ238791, AJ277030, AJ277031, AJ277033, AJ277034, AJ277076, AJ288751, AJ314601, AM746298, AM746312, AM746318, AM746320, AM746321, AM746329, AM746330, AM746332, AM746333, AM763303, AM763308, AM763309, AF367064, AF367065, AF367066, AF367067, AF367068, AF367069, AF367070, AF367071, AF411446, AY526219, EF488805, EF488806, EF211819, EF442087, DQ138133, DQ1381142, NC005224, PVU22423, PUUSSEG, mp70/Korea, Z21497, Z30705, Z30706, Z30708; **M-сегмент:** Sotkamo (X61034), Kazan (Z84205), UFA97 (AJ133582), Ufa-Bask (EU069361), CG17-Baskiria (AF442614), K-27 (PUUMG12A), CRF161Omsk (AF367061), CRF308Omsk (AF442617), CRF366Omsk (AF367063), CG168Omsk (AF367056), CG315Omsk (AF367059), CG144Omsk (AF367055), CG463Omsk (AF367060), CG215Omsk (AF442615), CG222Omsk (AF442616), Vindeln (Z49214), Virrat (Z70201), Sotkamo (X61034), CG 13891 (PVU22418), Umea Sweden (AY526218), Eidsvol (AJ223367), Germ-CG-Erfit (AJ238778), DQ518223, Osnabr (DQ518217), AJ227040, AJ227041, Kamiiso (AB011631).

Генотип Добрава/Белград. *S*-сегмент: Ano-Poroia/13Af (AJ410619), Ano-Poroia/19Af (NC005233), CAC20115, CAC85163, CAC85166, AF060018, AF060017, AF060023, AF805336, AF805337, HSNPSS, AAL35892, AAL35893, P-s 1223(AF442623), Slovakia-862-aA (AJ269550), CAA08819, CAA08821, CAA10489, CAA10481, Kurkino/44a (DV1131672), Kurkini/53a (DV1131673), Saar/160Aa (DV19773), Saar/90Aa/97 (DV19775), DV19773, DV1975, DV1131672, DV1131673; *M*-сегмент: Ano-Poroia/19Af (NC005234), ES/400Af/98 (AY168577), Slovakia862Af/98 (AY168578), Saar/160v (AJ009774), SK/AA (AY961616), Saar/90Aa/97 (DV19777).

Генотип Хантаан. *M*-сегмент: AA1028 (AF427325), NC167 (AB027115), CL-1 (HANCLY2), CUMC-B11 (HV37729), HU (AB027077), Q32 (AB027061), 84Fli (AF345636).

Генотип Тула. *S*-сегмент: Koziky/94/Slovakia (TVS223600), Kosice144/Slovakia (TV144NP), Kosice667/Slovakia (TV667NP), Malacky715/Slovakia (TV715NP), 064/Austria (U95309), 08/Austria (TV495313), 024/Austria (TV495302), 020/Austria (TV495304), 052/Austria (TV495303), K11/Austria (TV495305), K58/Austria (TV495311), K26/Austria (TV495310), K64/Austria (TV495312), G20s/Germany (AF164093), D5/98/Germany (AF289819), D17/98/Germany (AF289820), D563/98/Germany (AF289821), Lodz-1 (AF063897), Lodz-2 (AF063892), Malacky370/Slovakia (MVS37094), D539/Slovakia (TV539NP), 5302/94/Moravia (TULSM5302), 5294/94/Moravia (TULMOR94), 5286/94/Moravia (TULMOR86), 5243/94/Moravia (TULMOR93), Cacak/Serbia (AF017659), 76MA/87/Russia (TVSSEG1), 249MA/87/Russia (TVSSEG4), 175MA/87/Russia (TVSSEG3), 53MA/87/Russia (TVSSEG2), 23MA/87/Russia (TVSSEG5), MG23/Omsk (AF442621), MG22/Omsk (AF442620), LL2/Omsk (AF442618), LL58/Omsk (AF442619); *M*-сегмент: Kosice 144, Cacak (AF017658), D5-98, Lodz-1 (AF063891), C109-S, Kozik/5276, MOR/5276, MOR/5302 (TUVMS302), MOR/5286 (TULVM86M), Tula/53Ma (TULMT53M).

Генотип Топографов. *M*-сегмент: Топографов (AJ011647).

Хантавирусы генотипа Топографов. Впервые вирусы данного генотипа выявлены в 1994 г. в популяции сибирских леммингов (*Lemmus sibiricus*) в арктической тундре северного Таймыра [12, 13]. Нами в результате исследования мышевидных млекопитающих в переходных тундрах юго-западного Таймыра (нижнее течение р. Муксуниха) в 1994 г. были выявлены новые изоляты хантавирусов, циркулирующих в популяции сибирских леммингов (LS-1, LS-2) [3]. Высокий уровень гомологии (88%) полученного фрагмента М-сегмента генома (200 нуклеотидных пар) обоих изолятов с гомологичным участком генома хантавируса Топографов позволил отнести их к данному генотипу.

Поиски природных очагов хантавирусов в южных субарктических тундрах Ямала дали отрицательные результаты. В 2005 г. в легких полевки Миддендорфа (*Microtus middendorffii*, северные субарктические формации прибайдарецких тундр Ямала) был индцирован вирус, отнесенный на основании сходства первичной структуры фрагмента М-сегмента генома (82–85% гомологии) к генотипу Топографов (рис. 1). Величина расстояний между номинальной формой (Топографов) и двумя фрагментами ямальского изолята, рассчитанная с применением модели Kimura-2 parameter distance для данного фрагмента гена G2, варьирует в интервале от $0,170 \pm 0,032$ до $0,196 \pm 0,082$ при варьировании величины дистанции с хантавирусами других генотипов в интервале 1,418–2,441. Это указывает на выраженную однородность группы Топографов,

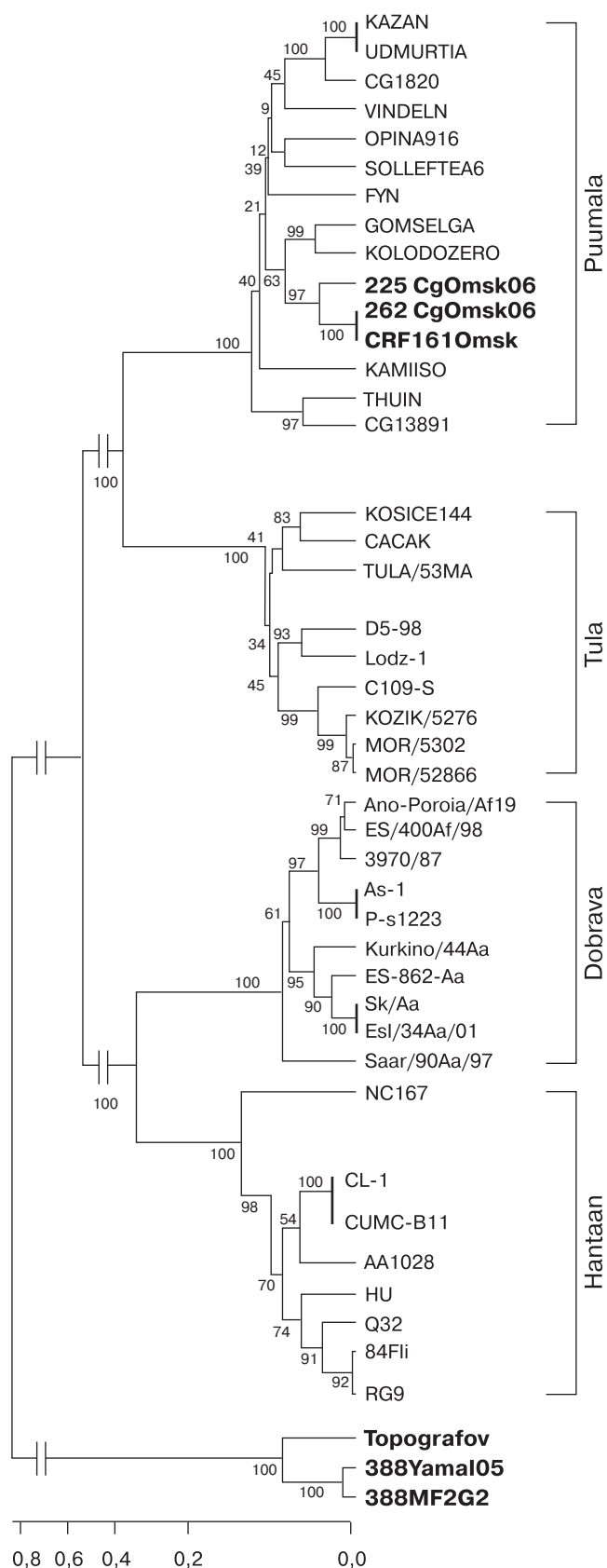


Рис. 1. Дендрограмма, отображающая положение ямальского хантавируса.

Фрагмент М-сегмента, комплементарный участку гена G2, протяженностью 260 нт с координатами 3040–3300 от начала кодирующей части (метод UPGMA, модель Kimura-2 parameter distance, величина бутстрепной выборки – 1000).

несмотря на увеличение величины дивергенции между географически удаленными вариантами (Топографов – LS-1, Топографов – ямалские), что, вероятно, связано с продолжительностью периода их взаимной изоляции.

Полученные данные позволяют говорить о достаточно широком мозаичном распространении хантавирусов данного генотипа в пределах северной субарктики и арктики Таймыра и Ямала. Возбудитель связан с популяциями сибирских леммингов, однако в годы депрессии численности последних (например, в 2005 г.) возможно инфицирование нетипичных хозяев, вероятно, при прямых контактах с леммингами. Этому могут способствовать идентичные требования обоих видов (сибирского лемминга и полевки Миддендорфа) к местообитаниям, однако уровень инфицированности нетипичных хозяев несопоставимо низок, в данном случае – по сравнению с сибирским леммингом. Так, на Ямале (1989 г. – пик численности) инфицированность *L. sibiricus* составляла $26,8 \pm 7,7\%$, на Таймыре (1994) – $44,4 \pm 18,1\%$.

Хантавирусы генотипа Пуумала. Природные очаги ГЛПС, ассоциированные с хантавирусами данного генотипа, локализованы в пределах подзоны мелколиственных лесов (подтайги) на восток до болотистых территорий Ишим-Иртышского междуречья. Возбудитель в пределах подтайги связан с двумя видами лесных полевок: рыжей – *Clethrionomys (Myodes) glareolus* и красно-серой – *Cl. (M.) rufocanus*. Последний вид в пределах Западной Сибири имеет выраженный мозаичный характер распространения.

Сравнение первичной структуры малого (не приводится) и среднего (рис. 2, а) сегментов генома сибирских изолятов хантавируса с имеющимися в банке данных последовательностями иного географического происхождения показывают их самостоятельное положение. Уровень гомологии, рассчитанный для фрагмента малого сегмента генома сибирских изолятов, демонстрирует высокую однородность группы независимо от источника изоляции – рыжей или красно-серой полевок ($99,3\text{--}99,8\%$). По отношению к другим группам наибольший уровень гомологии показан с финской группой ($87,0\text{--}88,4\%$). Это подтверждается и при расчете эволюционных расстояний: минимальные расстояния последовательностей сибирских изолятов хантавирусов отмечены по отношению к финской группе ($0,044 \pm 0,004$), в то время как с другими представителями генотипа эти величины в 3–5 раз выше: от $0,110\text{--}0,116 \pm 0,009$ по отношению к балканским и приуральским, до $0,282 \pm 0,014$ по отношению к китайским изолятам.

Уровень гомологии, рассчитанный для участков среднего сегмента генома вируса разной длины, имеет близкие значения. Внутригрупповое сходство первичной структуры сравниваемых участков генома сибирских изолятов высоко ($99,5\text{--}100\%$) и существенно

Таблица

Сезонные изменения уровня инфицированности полевок в природных очагах возбудителей ГЛПС, ассоциированных с вирусами генотипа Пуумала в Западной Сибири

Вид		Инфицированность, %	
		весна	осень
Омская область	<i>Cl. glareolus</i>	$50,0 \pm 10,9$	$13,6 \pm 9,9$
		$36,4 \pm 25,2$	н.д.
		$39,3 \pm 13,4$	н.д.
		$22,5 \pm 8,0$	$10,4 \pm 8,8$
	<i>Cl. rufocanus</i>	$23,5 \pm 15,0$	н.д.
		$20,8 \pm 12,2$	$11,1 \pm 9,9$
Тюменская область	<i>Cl. glareolus</i>	$61,1 \pm 15,1$	н.д.
		$36,8 \pm 5,1$	$12,2 \pm 4,3$
		$38,0 \pm 6,7$	$110,9 \pm 6,1$
		$38,6 \pm 12,7$	$14,3 \pm 7,1$
		$37,5 \pm 16,5$	$16,9 \pm 7,1$

превышает сходство с другими представителями генотипа. Аналогичные результаты получены и для последовательности гена G1 – при высоком внутригрупповом сходстве сибирских изолятов (не ниже $99,2\%$) сходство с остальными представителями генотипа находится в интервале $80,2\text{--}83,3\%$. Как и в случае последовательности гена G2, несколько выше (на $1,5\text{--}2,5\%$) гомология с приуральскими, а также (для гена G2) – со скандинавскими изолятами. Сходная картина складывается и при расчете эволюционных расстояний: при высокой однородности изолятов внутри группы $0,001\text{--}0,007 \pm 0,001\text{--}0,002$ меньшие расстояния для G1-гена отмечены для приуральских изолятов ($0,188\text{--}0,198 \pm 0,012$), чем для представителей иного географического происхождения ($0,213\text{--}0,234 \pm 0,012$).

При расчете расстояний для длинного фрагмента гена G2 (рис. 2, а), так же как и при расчете уровня гомологии, наблюдалась меньшая дистанцированность сибирских хантавирусов от скандинавских ($0,193\text{--}0,198 \pm 0,015\text{--}0,016$) и приуральских ($0,179\text{--}0,183 \pm 0,015$), по сравнению с другими представителями ($0,209\text{--}0,218 \pm 0,016$). При использовании для расчета расстояний короткого фрагмента никаких достоверных различий эволюционных расстояний сибирских изолятов по отношению к европейским не выявлено. Закономерно больше дистанцированность японского варианта – $0,268\text{--}0,282 \pm 0,043$.

Сибирская группа штаммов хантавируса формирует два кластера по географическому принципу – тюменский и омский, однако высокий уровень гомологии между кластерами подтверждает их принадлежность к одному геноварианту: внутри кластеров – $91,6\text{--}100\%$ и $88,0\text{--}98,8\%$ соответственно; между кластерами – $85,1\text{--}97,0\%$ (рис. 2, б).

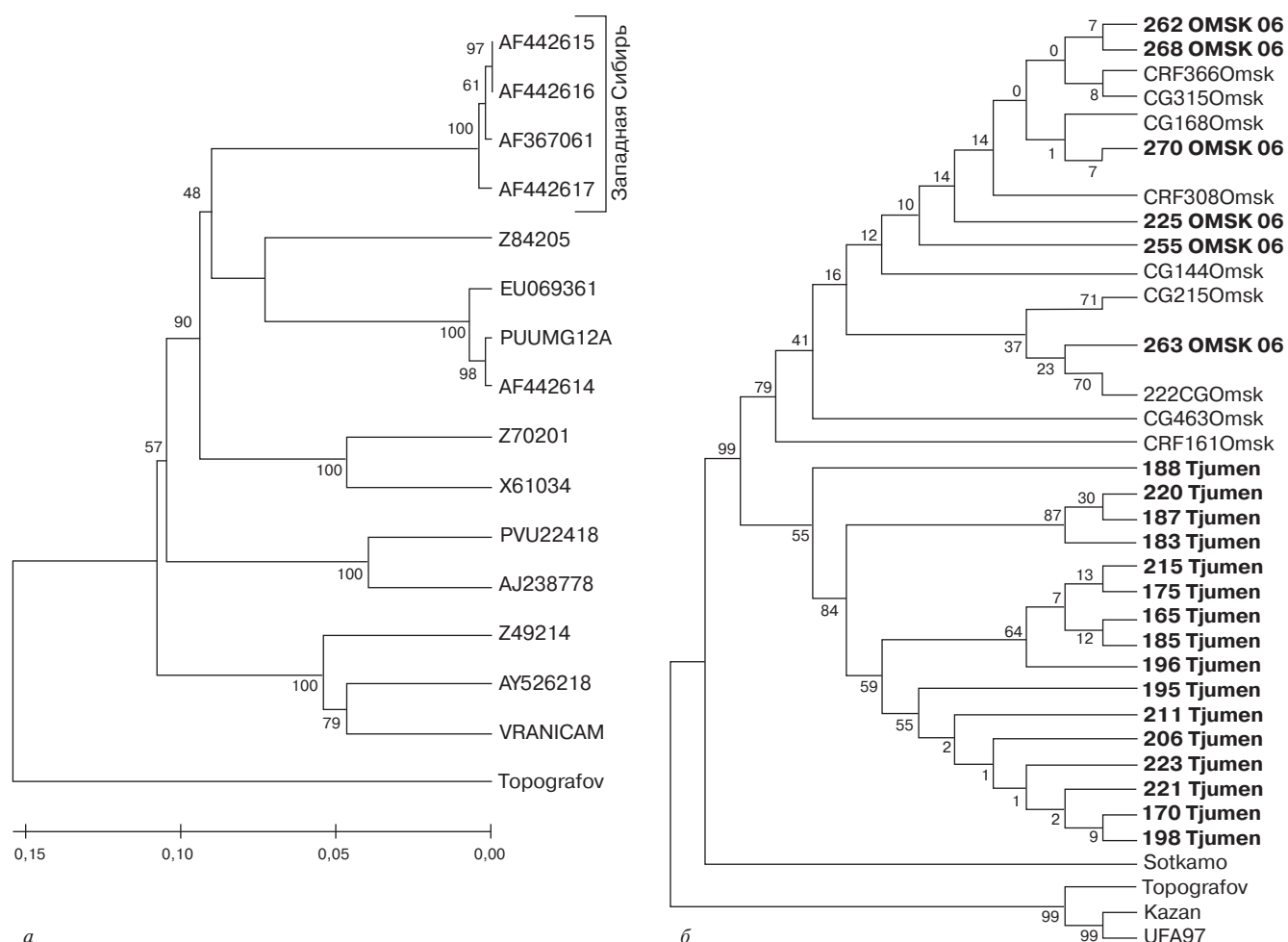


Рис. 2. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения сибирских изолятов с хантавирусами Пуумала иного географического происхождения (на основании анализа первичной структуры гомологичных фрагментов гена G2 разной длины).

а – 1041 нт, б – 234 нт. Метод UPGMA с использованием модели Kimura-2 parameter distance, величина бутстрепной выборки – 1000.

Среднемноголетняя инфицированность грызунов составляла $7,1 \pm 3,9\%$ на пойменных и $6,7 \pm 3,7\%$ – на внепойменных биоценозах, достигая максимума в липняках: $17,1 \pm 4,5\%$ ($22,2 \pm 6,9\%$ – рыжая и $14,8 \pm 7,0\%$ – красно-серая полевки). В местообитаниях иного типа этот показатель был для рыжей полевки в 2,5–4 раза ниже, а инфицированность красно-серой регистрировалась в единичных случаях. Для всех территорий региона, где постоянное существование природных очагов данного хантавируса подтверждается регулярным выявлением антигена в легких рыжей полевки, максимальный уровень инфицированности характерен для весеннего (после зимовки) периода, минимальный – для осеннего, перед началом зимовки (табл.). То есть за период зимовки происходит многократное возрастание инфицированности грызунов. С нашей точки зрения, это объясняется тем, что в условиях юга Западной Сибири период с конца сентября – начала октября до середины – конца апреля характеризуется наиболее стабильной пространственно-временной структурой их популяции. В этот период у грызунов выражена территориальная привязанность при отсутствии

каких-либо выраженных миграционных процессов, что многократно увеличивает вероятность внутри- и межвидовых контактов. В целом для видов лесных полевок в условиях совместных местообитаний характерно перекрытие индивидуальных участков и совместное использование по крайней мере части территории [6].

Кроме естественных хозяев на территории Тюменской области в пределах очаговых территорий хантавируса Пуумала отмечается периодическое выявление инфицированности красных полевок – *C. (M.) rutilus* (3–5%) и обыкновенных землероек – *Sorex araneus* (до 2%).

Хантавирусы генотипа Добrava/Белград. На возможность существования в Западной Сибири природных очагов ГЛПС, ассоциированных с хантавирусами данного генотипа, было указано в связи с выявлением трех случаев заболевания людей в 1998 г. в одном из районов Омской области [4]. Однако локализация природных очагов данного возбудителя была установлена только в 2005 г. Присутствие хантавируса Добrava/Белград установлено в очаговых биоценозах южной части подзоны мелколиственных лесов (под-

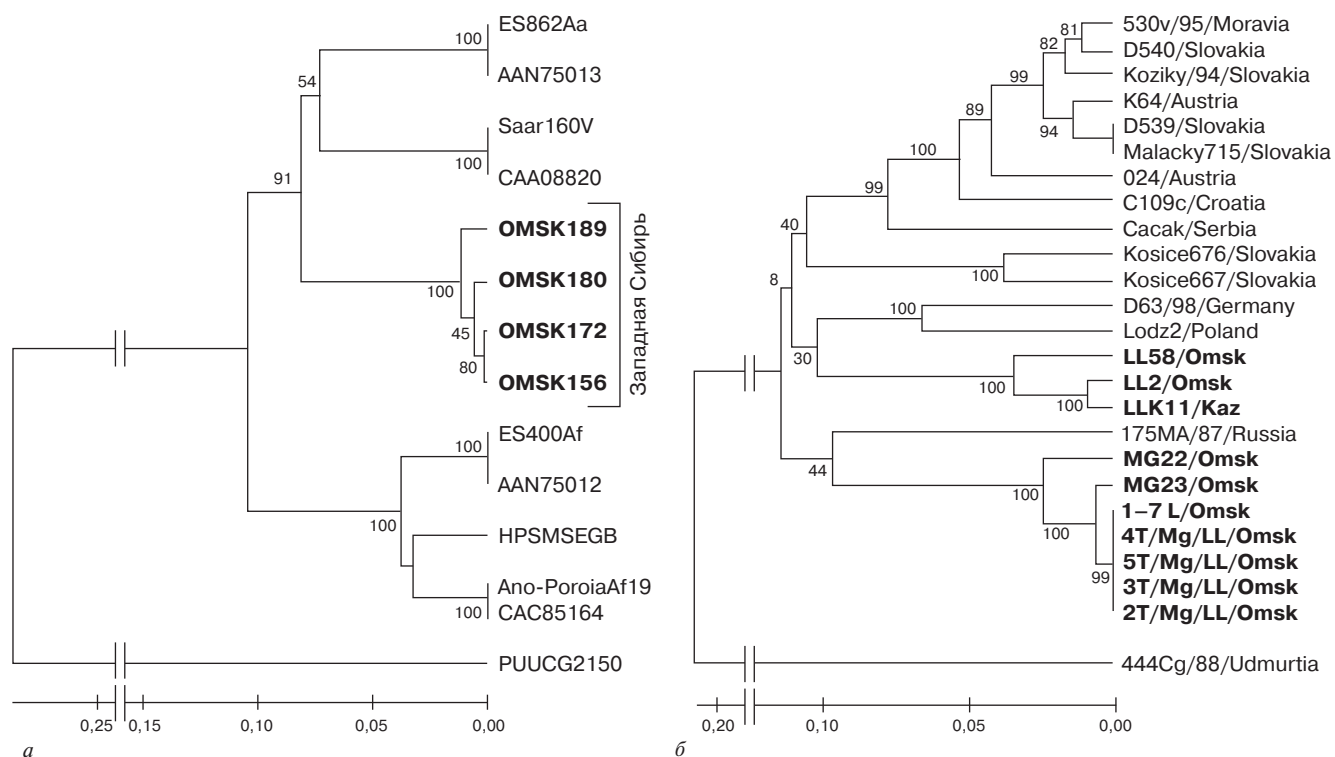


Рис. 3. Дендрограммы, отображающие положение Западно-Сибирских хантавирусов генотипа Доброва/Белград (а) и Тула (б). а — фрагмент М-сегмента, комплементарный участку гена G2, протяженностью 258 нт с координатами 3017–3274 нт от начала кодирующей части; б — фрагмент S-сегмента, комплементарный участку гена N, протяженностью 235 нт с координатами 530–765 нт от начала кодирующей части. Метод UPGMA, модель Kimura-2 parameter distance, величина бутстрепной выборки — 1000.

тайги) Омской области в популяциях полевой мыши *Apodemus agrarius*. Территориально природные очаги данного возбудителя сопряжены с очагами, ассоциированными с хантавирусами генотипа Пуумала, однако выявить оба возбудителя на общей территории одновременно не удастся.

Сравнение гомологичных фрагментов малого сегмента генома омского изолята хантавируса с имеющимися в банке данных (не приводится) показывает высокий уровень гомологии первичной структуры с группой изолятов Куркино (92,3–92,5%) при уровне гомологии с другими представителями в интервале 83,8–88,7%. При этом уровень гомологии всех вариантов Доброва с представителем Пуумала составляет 54,4–58,6% (кроме изолятов из Венгрии — 30–32%). Расстояния, рассчитанные с применением модели Kimura-2 parameter distance, показывают достаточно однородный характер дистанцирования омского изолята от представителей других групп, что составляет от $0,146 \pm 0,029$ до $0,186 \pm 0,033$ ($p > 0,05$). При этом расстояние с внешней группой (Пуумала) находится в интервале $0,791–0,897 \pm 0,160–0,127$.

Сравнение гомологичных фрагментов среднего сегмента генома омских изолятов с другими представителями данного генотипа (рис. 3, а) показывает высокий внутригрупповой уровень гомологии (94,8–97,6%) первичной структуры при уровне гомологии с другими представителями хантавирусов Доброва в интервале 78,2–86,5%. Расстояния, рассчитанные с применением Kimura-2 parameter distance,

показывают однородность омской группы изолятов ($0,014 \pm 0,003$). Дистанцированность от представителей других групп вирусов Доброва находится в интервале $0,107 \pm 0,025–0,178 \pm 0,029$ при расстоянии относительно внешней группы (вирус Пуумала) в интервале от $0,492 \pm 0,035$ до $0,596 \pm 0,061$.

В целом получаемые для фрагментов обоих сегментов генома хантавируса разными методами расчета дендрограммы имеют, как правило, звездчатый характер (не приводится), что демонстрируется сходством длины ветвей разных кластеров. Например, при применении методов UPGMA или NJ и моделей расчета Kimura-2 distance parameter или P-distance длина ветвей при расхождении от общего узла составляла соответственно от 0,102–0,104 (с внешней группой — 0,360) или 0,085–0,088 (М-сегмент) и 0,072–0,089 или 0,066–0,075 (S-сегмент). Это дает основание предполагать самостоятельное положение сибирского варианта генотипа, с одной стороны, и единовременное расхождение от некоего предкового варианта современных геновариантов (сибирского в том числе), с другой.

Как и в случае вируса генотипа Пуумала, для вирусов Доброва/Белград в Западной Сибири, по-видимому, характерно широкое, но мозаичное распространение. Это можно предполагать на основании периодического выявления в легких полевой, а в ряде случаев — и малой азиатской мыши (*A. uralensis*) вирусных антигенов. За 22-летний период наблюдений на территории Тюменской области инфицирован-

ность полевых мышей регистрировалась на территории четырех (из шести) стационарных точек наблюдения в пределах лесной зоны области и составляла от 0,8 до 4,9%, малой азиатской мыши — на территории трех (из шести) и составляла от 1, до 6,1%. Только на одной из наблюдаемых территорий (бассейн р. Тобол) инфицированность полевых мышей выявлялась регулярно с периодичностью 1–2 года, на остальных территориях она регистрировалась спорадически.

Хантавирусы генотипа Тула. Природные очаги возбудителей, относящихся к данному генотипу, впервые были обнаружены в 1997 г. в степной зоне на территории Омской области [10, 11]. Вирусы циркулируют в популяциях грызунов степной фауны: узкочерепной полевки *Microtus gregalis* и степной пеструшки *Lagurus lagurus*. В ходе последующих работ был подтвержден устойчивый характер циркуляции хантавирусов генотипа Тула в степной зоне Западной Сибири (включая территорию северного Казахстана). Эпизодически вирус регистрируется в лесостепи.

В результате сравнения первичной структуры гомологичных фрагментов малого сегмента генома РНК-изолятов вируса от двух видов грызунов было установлено их самостоятельное положение по отношению друг к другу (рис. 3, в). Уровень гомологии между изолятами, полученными от одного вида грызунов (93,8% — LL2/Omsk и LL58/Omsk; 94,7% — Mg22/Omsk и Mg23/Omsk), значительно превышает уровень гомологии между ними, составляющий 80,3–81,9%, и соответствует уровням гомологии данных изолятов с иными представителями Тула-подобных вирусов (79,1–84,4%). Это подтверждают и значения эволюционных дистанций: между гомологичными изолятами — $0,066 \pm 0,010$ и $0,055 \pm 0,009$ (от пеструшек и узкочерепных полевок соответственно), между этими группами — $0,199 \pm 0,018$ — $0,221 \pm 0,019$. Подобная величина варьирования показателей эволюционной дистанции соответствует величине межгрупповой дистанции ($0,174 \pm 0,016$ — $0,224 \pm 0,019$) с изолятами иного географического происхождения.

Возможность существования на единой территории двух геновариантов вирусов генотипа Тула обеспечивается, с нашей точки зрения, особенностями пространственно-временной структуры популяций двух видов грызунов — хозяев данных вариантов. Так, в годы низкой численности популяционные группировки обоих видов организованы по принципу пространственного разобщения, в годы высокой численности (когда вследствие дефицита территорий происходит перекрытие поселений двух видов) общие участки используются видами в разное время [7]. В обоих случаях сводится к минимуму вероятность прямых контактов данных видов животных. В целом для природных очагов, ассоциированных с хантавирусами данного генотипа в Западной Сибири, характерно возрастание эпизоотической активности очага к осени, что проявляется в росте уровня

инфицированности грызунов в 2,5–3 раза (от 4–6% в мае-июне до 16–20% в сентябре).

Таким образом, в Западной Сибири существуют природные очаги возбудителей хантавирусных инфекций, ассоциированные с четырьмя генотипами: Пуумала, Добрава/Белград, Тула и Топографов. Полученные результаты позволяют говорить о существующем разрыве ареала хантавирусов генотипа Пуумала к востоку от р. Иртыш. Таежные территории, лесотундра и южные субарктические тундры, по-видимому, полностью свободны от хантавирусов. Эпизодические обнаружения специфических антигенов в легких мышевидных млекопитающих в южно-таежных типах местообитаний следует рассматривать, с нашей точки зрения, как эфемерные очаги инфекции, существующие в пределах срока жизни инфицированных особей. Как правило, инфицированных животных в пределах данной ландшафтной зоны выявляли в приречных местообитаниях рек Иртыш, Тобол или их притоков [10, 11], вдоль которых возможно проникновение инфицированных животных достаточно далеко за пределы очаговых территорий. В лесостепи возможна циркуляция хантавирусов генотипа Тула в лугополевых биоценозах, однако генотипы Пуумала и Добрава на территории данной ландшафтной зоны не обнаружены, несмотря на устойчивый рост численности после 1990 г. рыжей полевки в северной подзоне.

Хозяевами хантавируса генотипа Пуумала в регионе являются два вида лесных полевок (рыжая и красно-серая). Западная Сибирь — единственная территория, где данный феномен имеет место. Рассценивать этот эффект можно как с позиций переключения возбудителя с одного хозяина на другого на фоне вероятных реколонизаций территории рыжей полемкой (единственно признаваемой хозяином данного возбудителя в Европе) в последледниковье, так и с позиций реликтового происхождения феномена, так как на Дальнем Востоке и в Японии красно-серая полевка (вместе с видами-викариантами) — единственный хозяин вируса Пуумала. Обращает на себя внимание и выраженная (но не абсолютная) территориальная приуроченность природных очагов данного возбудителя к липовым или имеющим липу в своем составе лесам. Эти типы лесов в регионе имеют реликтовое происхождение. Звездчатый характер дендрограмм, характеризующих филогенетические отношения в группе данных хантавирусов, позволяет предполагать кратковременный характер адаптивной радиации гипотетического прототипа, давшей европейские и сибирские варианты. В последующий период эволюция представителей различных групп (кластеров), по-видимому, имела (по крайней мере в пределах равнинной части Европы) сходные закономерности, что и отражается в относительной равноудаленности представителей разных кластеров от некоего гипотетического прототипа.

Распределение природных очагов всех четырех групп возбудителей имеет мозаичный характер. Это выражается в отсутствии или периодическом (нерегулярном) выявлении инфицированности естественных хозяев в местах обитания, не имеющих внешних различий с типичными очаговыми территориями. Активность эпизоотического процесса в природных очагах, по крайней мере хантавирусов генотипов Пуумала и Тула, имеет диаметрально противоположную направленность. Мы склонны объяснять это с позиций особенностей экологии хозяев. Так, рост инфицированности хозяев вируса Пуумала совпадает с периодом максимальной стабильности (при наибольшей продолжительности во времени) пространственно-временной структуры популяций. В этот период характерна привязанность грызунов к конкретной территории, при этом частота внутри- и межвидовых контактов на таких территориях, сопряженных с совместным ее использованием (кормодобывание, гнезда и убежища), резко возрастает. Напротив, вторая половина лета и начало осени характеризуется (несмотря на рост численности) наименее стабильным характером структуры популяций, а продолжительность размножения грызунов несопоставимо меньше продолжительности зимовки.

Возможность существования двух вариантов хантавирусов генотипа Тула также объяснима с позиций особенностей биологии видов. Особенности их существования в аридных условиях степей обеспечивают особую динамику структуры популяций, отличную от таковой у обитателей лесной зоны, что отражается на специфике эпизоотического процесса. В частности, семейно-групповой характер поселений грызунов обеспечивает высокий уровень внутривидовых контактов. Кроме того, после зимовки и весеннего размножения из поселений грызунов (в том числе и на территории очагов) откочевывают перезимовавшие и давшие потомство особи (что принципиально отличает эти виды от обитателей леса).

Выявление хантавируса генотипа Топографов у нетипичного хозяина (полевки Миддендорфа), с нашей точки зрения, следует рассматривать как индикацию присутствия возбудителя на территории в популяции леммингов, находящейся на момент проведения исследований в состоянии депрессии численности. В целом проведенные работы подтвердили предположение о территориальной привязанности природных очагов данного хантавируса к северным субарктическим и арктическим тундрам (при их отсутствии на территории южных тундр).

Литература

1. Апекина Н.С., Бернштейн А.Д., Мясников Ю.А. и др. // *Вопр. регион. гигиены, санитарии и эпидемиол.* — 1990. — Вып. 3. — С. 157–158.
2. Гарицина С.Б., Корнеев А.Г., Журавлев В.И. и др. //

Молекулярная диагностика : сборник трудов 6-й Всероссийской конференции. — М., 2007. — Т. 1. — С. 365–370.

3. Деконенко А.Е., Ткаченко Е.А., Липская Г.Ю. и др. // *Вопросы вирусологии.* — 1996. — Т. 41, № 1. — С. 24–27.
4. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Чу Е.К. и др. // *Актуальные проблемы мед. вирусологии.* — М., 1999. — Т. 2. — С. 60.
5. Лебедев А.Д. // *Медицинская география.* — М., 1964.
6. Малькова М.Г., Пальчих Н.А., Якименко В.В., Кузьмин И.В. // *Экология.* — 2004. — № 1. — С. 34–42.
7. Малькова М.Г., Якименко В.В. // *Экология.* — 2007. — Т. 38, № 3. — С. 207–215.
8. Мясников Ю.А., Ткаченко Е.А., Иванов А.П. и др. // *Природно-очаговые инфекции и инвазии.* — Омск, 1984. — С. 134–140.
9. Мясников Ю.А., Апекина Н.С., Зуевский А.П. и др. // *Итоги науки и техники : сер. вирусология.* — М., 1991. — Т. 24. — С. 122–123.
10. Якименко В.В., Деконенко А.Е., Малькова М.Г. и др. // *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* — 2000. — № 3. — С. 21–28.
11. Якименко В.В., Деконенко А.Е., Малькова М.Г. и др. // *Природно-очаговые болезни человека : сб. научных работ.* — Омск, 2001. — С. 32–39.
12. Plyusnin A., Vapalahti O., Lundkvist A. et al. // *Lancet.* — 1996. — Vol. 347. — P. 1835–1836.
13. Vapalahti O., Lundkvist A., Fedorov V. et al. // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73, No. 7. — P. 5586–5592.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

RESULTS OF HANTAVIRUS STUDYING IN WESTERN SIBERIA

V.V. Jakimenko¹, S.B. Garanina², M.G. Malkova¹, A.V. Valitskaya³, G.A. Konstantinova³, A.K. Tantsev¹, S.V. Luchko¹, A.A. Matushchenko¹, D.O. Irbaev⁴, A.E. Platonov², G.A. Shipulin²

¹Omsk scientific research institute of the natural infections Rospotrebnadzor, ²Central scientific research institute of the epidemiology Moscow, ³Center of hygiene and epidemiology in Tyumen area (Tyumen), ⁴Pavlodar pedagogical university
Summary — The characteristic of the natural reservoir of Hantavirus infection connected to viruses of four genotypes (Topographers, Puumala, Dobrava/Belgrad and Tula), circulating in ecologic systems of various landscape zones in three areas of Western Siberia is given. Distribution of the natural reservoir of all four groups of virus has the expressed mosaic character. Arctic Hantavirus of genotype of Topographers is associated with Siberian rodents in geographically removed territories. In Western Siberia viruses Puumala are submitted by a variant connected to populations of red mice. The natural reservoir of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, associated with Hantavirus infection Dobrava/Belgrad, are related for a wood zone of region, connected to populations of the field mouse and territorially blocked with the reservoir of Hantavirus Puumala. The genotype Tula is submitted to two variants connected specific rodents. The activity of the epizootic process in the natural centers of Hantavirus is caused by features of ecology of rodents.

Key words: hantavirus infection, a genotype, gene variant, epizootic process.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 20–26.

УДК 578.833.29:578.53

Ж.С. Тюлько¹, В.В. Якименко²

¹ Омская государственная медицинская академия, ² Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора

К ВОПРОСУ О ТЕМПАХ ЭВОЛЮЦИИ ХАНТАВИРУСОВ ГЕНОТИПА ПУУМАЛА

Ключевые слова: хантавирусы, Пуумала, митохондриальный геном, цитохром В, филогения

Пуумала-подобные хантавирусы формируют десять кластеров, имеющих относительную географическую приуроченность. Звездчатая структура деревьев предполагает давнее расхождение данных групп. В каждой группе (за исключением сибирской) сохраняется связь с одним видом грызунов-хозяев. Сравнивая внутри- и межкластерные генетические расстояния и уровни гомологии между последовательностями, можно предположить возможность совсем недавнего «переключения» вирусов Пуумала с *Clethrionomys glareolus* на *Clethrionomys rufocanus* в Западной Сибири, где генетическая близость полевок этих подродов может объясняться их длительным сосуществованием в перекрывающихся экологических нишах.

Идея совместной эволюции паразитов и их хозяев является основной в анализе их филогенетических взаимоотношений [14]. Принято, что изменения в популяции паразитов тесно связаны с изменениями в популяции хозяев и скорость паразитарной эволюции зависит от скорости эволюции хозяев. Для оценки времени эволюции используется представление о молекулярных часах, основанное на теории нейтральности, которая предполагает вероятность изменений в единицу времени постоянной [2].

Традиционно генетические последовательности хантавирусов считаются очень медленно эволюционирующими, а сами хантавирусы строго специфичными определенному кругу хозяев-грызунов, относящихся к трем основным подсемействам: *Murinae*, *Arvicolinae* и *Sigmodontinae* [19]. Однако с учетом того, что в последние годы были получены факты о возможности переключения хантавирусов с одного вида хозяев на другой [24], а также о наличии у них гомологичной рекомбинации [20, 21], эта точка зрения может быть развита и дополнена. И для лучшего представления об эволюции хантавирусов требуется привлекать данные не только об эволюции хозяев, но и об их географической распространенности, возможных путях миграции и сведения о временной или географической изоляции. Может быть, при этом следует учитывать возможность рекомбинации у вирусов (при нарушении изоляции) и образования гибридных геновариантов.

Мелкие грызуны-полевки многочисленны и встречаются повсеместно в Евразии от Европы до Японии и в Северной Америке. Подсемейство полевок состоит из 16 родов, из которых наиболее разнообразным является род *Microtus* (60 видов). В соответствии с молекулярными филогенетическими исследованиями [9] эволюционная история этих грызунов характеризуется двумя волнами видообразования, т.е. интен-

сивным расхождением в исторически короткий период времени. Полевки и лемминги севера Евразии и Северной Америки являются результатом внутривидового расхождения, произошедшего в результате разделения и изоляции частей популяции в период оледенения [13], и выделяются в монофилетическую группу – *Glires* [18].

Хантавирусы генотипа Пуумала были обнаружены у красно-серой (*Clethrionomys rufocanus*) и рыжей (*Clethrionomys glareolus*) полевок. Полевки этих подродов способны существовать в сходных условиях и занимать перекрывающиеся экологические ниши, хотя *C. rufocanus* выживает в условиях более суровых, чем *C. glareolus*, что позволяет использовать динамику соотношения численности представителей этих подродов во времени как один из показателей ландшафтно-климатических изменений [5].

Общепринятым является представление о европейском происхождении рыжей полевки (*C. glareolus*). Есть мнение, что лишь в относительно недавнее время рыжая полевка стала распространяться по лесным биотопам европейского типа на восток, хотя на территории Западной Сибири уже в среднем плейстоцене обитали полевки с признаками *C. rufocanus*, *C. rutilus* и *C. glareolus* [4]. Ледниковый и межледниковый периоды в плейстоцене сильно повлияли на эволюцию видов в рассматриваемом регионе. Периоды изоляции групп близкородственных видов, ведущие к дифференциации, сменялись периодами реколонизации, которые способствовали возникновению гибридных форм, что запечатлевалось в генетических последовательностях. Наиболее изучены в этом отношении палеогеографические области – Берингия [12] и Фенноскандия [22], есть некоторые сведения по Западной Сибири [4] и европейской части России [23].

В нашем исследовании использовались нуклеотидные последовательности малого сегмента генома хантавирусов и митохондриального генома полевок. В приводимом ниже списке указываются названия использованных РНК-изолатов хантавирусов (в скобках – код доступа в банке EMBL).

1. Пуумала, полученные от красно-серой полевки (*C. rufocanus*). Россия: Омская область – CRF161 (AF367069), CRF366 (AF367071), CRF308 (AF367070); Китай: Fusong 200-05 (EF211820), Fusong-Cr-247 (EF442087), Fusong 843 (EF488805); Япония: Kamiiso (AB010730), Tobetsu (AB010731).

2. Пуумала, полученные от рыжей полевки (*C. glareolus*). Россия: Омская область – CG144 (AF367064), CG168 (AF367065), CG215 (AF367066); Башкирия – DTK/Ufa (AB297665), CG/Bashkiria (AF442613), CG1820 (M32750), P360/RUS (L11347), Татарстан –

Puu/Kazan (Z84204), Удмуртия – Udmurt/894Cg (Z21497), Самара – CG142 (AF411447), Baltic/205 (AJ314599), Baltic/49 (AJ314598), Карелия – Karhumäki (AJ238788), Gomselga (AJ238790), Kolodozero (AJ238789), Pallasjarvi (AJ314597); Финляндия: Evo/12 (Z30702), Evo/15 (Z30705), Sotkamo (X61035), Puu/1324Cg (Z46942); Норвегия: Mellanse149 (AJ223375), Hundberget (AJ223371), Tavelsjo (AJ223380), Sollefteå3 (AJ223376), Eidsvoll1124 (AJ223368); Швеция: Bussjo_98-1 (AM746300), Vindeln (Z48586), Palbole_98-1 (AM746327), Palbole_98-3 (AM746329), Palbole_98-4 (AM746330), Gumboda_98-2 (AM746316), Skaran_98-1 (AM746331), Norum_98-5 (AM746324), Djaknebole_98-1 (AM746310); Босния и Герцеговина: Vranica (U14137); Дания: Fyn47 (AJ278092), Fyn131 (AJ278093); Европа: Balkan-1(AJ314600); Австрия: Klippitztoerl (AJ888751), Ernstbrunn (AJ888752); Словакия: Opina916 (AF294652); Франция: Mignovillard (AM695638), CG_13891 (U22423); Германия: CgErft (AJ238779); Бельгия: CG14445 (AJ277076), Montbliart (AJ277031), Thuin(AJ277030), Momignies-55 (AJ277033), Couvin (AJ277034).

3. Пуумала, полученные от человека. Россия: Башкирия – K27 (L08804), Самара – F-s808 (AF411446); Финляндия: Virrat (D69985); Швеция: Umea/hu (AY526219); Германия: Heidelberg/hu (DQ094844); Китай: Fusong48 (AY197740).

4. Негруппированные хантавирусы, полученные на территории России от леммингов (*Lemmus sibiricus*) – Torografov (AJ011646) и большой полевки (*Microtus fortis*) – Khabarovsk (U35255).

Митохондриальный геном полевок представлен последовательностью цитохрома В и фрагментом последовательности легкой петли – L (в скобках – код доступа в банке EMBL). Использован следующий перечень последовательностей цитохрома В.

1. Красно-серая полевка (*C. rufocanus*). Россия: Омская обл. – CRF161_Omsk (AF367073), CRF179_Omsk (AY133317), CRF333_Omsk (AY133320), DK29-97_Magadan (AB031580), CRF890_Khabarovsk (AF429816), HS943_Vladivostok (AB017236), HS944_Vladivostok (AB031572), IK100-97_Khamchatska (AB031577), CRF443_Polar_Ural (AF367072), HS639_Sakhalin (AB031576), IK115-96_Ussuriskiy (AB031565); Финляндия: AF#3145_Finland (AF429815); Япония: HEGRB-2_Rebun_Is (AB031554), HS227_Rishiri_Is (AB031553), TEK28-38_Taraku_Is (AB031564), HEG117_Takinoue (AB031561), HEG141_Nemuro (AB031555); Китай: Fusong-629 (EF442096), Fusong-736 (EF442098).

2. Рыжая полевка (*C. glareolus*). Россия: Башкирия – CG28B (AF429795), CG29B (AF429796), CG3B(AF429794), Уральские горы – Ural (AJ639673), Новосибирская обл. – CG12H (AF367075), CG14H (AF429810), CG15H (AF367076), Омская обл. – CG196 (AF429785), CG206-Omsk (AF429786), CG215 (AF429787), CG222 (AF367074), Нижний Новгород – CG24NN (AF429799), CG33NN (AF429801), CG36 (AF367083), CG40NN (AF429805), CG42NN (AF429806), Самарская область – CG142 (AF367080), CG230 (AF411449); Украина: Rovno (DQ472247), Kiev_18 (DQ472230); Швеция: CG/uam24441 (AY185800); Германия: Germany(AJ867974); Финляндия: Sotkamo_1946 (AF429812), CG/uam24476 (AY185797), CG/uam24474 (AY185796); Польша: Poland (AJ639669); Бельгия: Belgium_Leerns (AJ867965), Belgium (AJ867961); Англия: Gwent (AJ639665); Чехия: Praha (DQ472259); Швейцария: Switzerland (AJ639674); Сербия: Serbia (AJ639706); Словакия: Kosice (AJ867948); Македония: Macedonia (AJ639660); Болгария: Bulgaria (AJ639699); Италия: Italia (AJ639663); Франция: Navarre (AJ639671), France (AJ639678); 51090 (AF159401).

3. Красно-серая полевка (*Clethrionomys rex*). Япония: HEG96Crx-1 Takinoue (AB031582).

4. Красная полевка (*Clethrionomys rutilus*) Япония: HEG135-98 Nemuro (AB031581).

Фрагменты последовательности легкой петли (L) представлены:

1. Красно-серая полевка (*C. rufocanus*). Россия: Омская обл. – Omsk_CRF161 (AF367073), Omsk_CRF187 (AY133318), Omsk_CRF179 (AY133317), Omsk_CRF333 (AY133320), Omsk_CRF308 (AY133319), Omsk_CRF468 (AY133322), Новосибирская обл. –

CRF686_Novosibirsk(DQ121410), Полярный Урал – CRF443PolUral (AY133321), Хабаровский край – Khabarovskiy_kr_CRF718 (AY133329), Приморье: Russia_CRF74307 (AY491386), Russia_CRF74282(AY491385); Япония: Hokkaydo_E (AB104405), Hokkaydo_K (AB104411), Hokkaydo_F (AB104406), Hokkaydo_G (AB104407), Hokkaydo_H (AB104408), Hokkaydo_I (AB104408), Hokkaydo_A (AB104401), Hokkaydo_J (AB104410) гаплотип Hokkaydo_C. rutilus (AB265683), гаплотип Hokkaydo_C. rex (AB265684); Северная Норвегия: Norway_A (AJ306659), Norway_G (AJ306665), Norway_E (AJ306663), Norway_J (AJ306668), Norway_C (AJ306661); Финляндия: Finland_CRF3143 (AY133323), Finland_CRF3145 (AY133328).

2. Рыжая полевка (*C. glareolus*). Россия: Омская обл. – CG182-Omsk (AY133306), CG193-Omsk (AY133307), CG206-Omsk (AY133308), CG215-Omsk (AY133309), CG216-Omsk (AY133310), CG221-Omsk (AY133311), CG315-Omsk (AY133312), CG324-Omsk (AY133313), CG325-Omsk (AY133314), CG467-Omsk (AY133315), Новосибирская обл. – CG12H (AY133303), CG14H (AY133304); CG16H (AY133305), Нижний Новгород – CG36/NN (AY133323), CG56/NN (AY133324); Финляндия: CG1946-Sotkamo (AF429812), CG3306-Sotkamo (AF429813); Австрия: ST_47-Austria (AJ236833).

При анализе сопряженности темпов эволюции хозяев и хантавирусов генотипа Пуумала учитывали следующие параметры:

- оценка предполагаемой скорости эволюции хантавирусов: скорость синонимичных замен на нуклеотид в год для S-сегмента – от $0,7 \times 10^{-7}$ до 3×10^{-6} [22];
- оценка предполагаемой скорости эволюции цитохрома В: скорость синонимичных замен на нуклеотид в год примерно $2,5 \times 10^{-8}$ [15];
- временная шкала, сопоставляющая этапы эволюции вирусов Пуумала и палеонтологические данные, дает следующие точки отсчета: 1) дивергенция *Microtus* – *Clethrionomys* – 7–8 млн лет [16], 2) дивергенция *C. rufocanus* – 4,2–4,8 млн лет [17], 3) возникновение японских Пуумала-подобных вирусов – 85–100 тыс. лет [22], 4) разделение современных линий вируса Пуумала – 17–21 тыс. лет [22];
- для сравнения деревьев и оценки совпадения темпов эволюции вирусов и хозяев подсчитывался коэффициент корреляции между длинами ветвей, связывающих вирусные и митохондриальные последовательности из одинаковых географических областей.

Для множественного выравнивания последовательностей и построения филогений применялась программа Clustal X (1.8) со следующими значениями параметров функции Multiple Alignments: Gap Opening=20, Delay Divergent Sequences=30%, Transition Weight=0,6; при расчете филогенетических деревьев методом «ближайшего соседа» применялось значение параметра Bootstrap Replicates ≥ 1000 .

Весь массив Пуумала-подобных хантавирусов формирует десять кластеров (рис. 1), имеющих относительную географическую приуроченность: 1) Китай, 2) Япония, 3) Россия (Приуралье с примыкающими балтийскими последовательностями), 4) Россия (Омская область), 5) карело-финская группа, 6) Швеция и Норвегия, 7) Дания, 8) Норвегия, 9) восточно-европейская группа (Австрия и Балканские страны), 10) центрально-европейская группа (Германия, Франция, Бельгия). Полученное дерево имеет звездчатую форму, что при допущении о постоянстве и равенстве

скорости дивергенции в различных ветвях дает основание предполагать достаточно давнее расхождение данных групп [22]. В каждой группе сохраняется принадлежность только к одному виду хозяев, за исключением изолятов с территории Омской области, которые объединяются в один кластер, несмотря на принадлежность хозяев-грызунов к разным видам.

Дендрограммы, отображающие филогенетические отношения двух видов хозяев хантавирусов генотипа Пуумала, рассчитаны на основании фрагментов последовательности цитохрома В (рис. 2) и легкой петли (L) митохондриального генома (рис. 3). Оба дерева имеют схожую структуру: три группы кластеров (японский, уральско-скандинавский, дальневосточный), включают в себя последовательности красно-серых полевков, два отдельных кластера – последовательности рыжих полевков. Кластер, обозначенный «*C. glareolus* + *C. rufocanus*», включает последовательности рыжих полевков из Европы и России и западно-сибирских красно-серых полевков. Отчасти эта схема кластеризации соответствует схеме, изображенной на рис. 1. На всех схемах последовательности геномов разных видов полевков (или выделенных от них вирусов) принадлежат к разным кластерам, за исключением изолятов Омской области.

По этим деревьям видно, что расстояния, рассчитанные для генетических последовательностей, зачастую показывают картину, не совпадающую с картиной географического распределения хантавирусов и их хозяев: географически удаленные варианты оказываются более схожими между собой, чем соседние. Это говорит о сложной эволюционной истории данных видов и подтверждает необходимость привлечения дополнительных данных для выявления эволюционных путей как вирусов, так и их хозяев.

Внутри кластера «*C. glareolus* + *C. rufocanus*» вообще не наблюдается корреляции между географическими и генетическими расстояниями. Практически одинаковыми оказываются генетические расстояния и между последовательностями из этого кластера, принадлежащими к разным видам. Если считать время происхождения видов *C. glareolus* и *C. rufocanus* одним и тем же для всех ветвей филогенетического дерева, то для последовательностей этого кластера выявляются значительно меньшие, чем обычно для митохондриальных последовательностей, скорости синонимичных замен (около 10^{-9}), что вряд ли соответствует действительности. Такие противоречия обычно объясняют либо неодинаковой скоростью накопления замен в разных ветвях деревьев, либо нивелирующим действием рекомбинационных процессов при условии периодических попаданий субпопуляций грызунов разных видов в одну экологическую нишу (что может быть связано с особенностями климатических процессов в течение последнего оледенения и последующего периода).

Некоторая зависимость от географических расстояний наблюдается при дистанцировании последовательностей цитохрома В из изолятов, расположенных

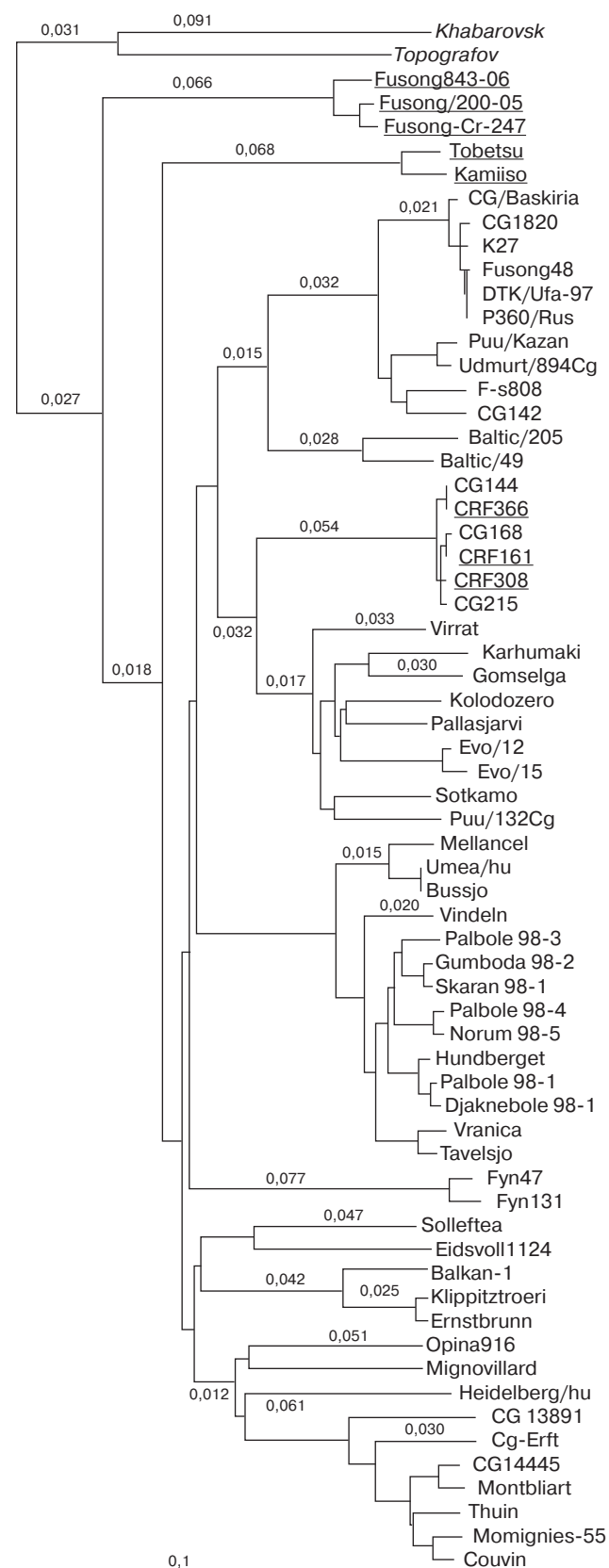


Рис. 1. Филогения, построенная по общему фрагменту нуклеотидной последовательности 905 н.о. S-сегментов вирусов генотипа Пуумала и двух неклассифицированных вирусов Topografov и Khabarovsk, полученных соответственно от *L. sibiricus* и *M. fortis*. Подчеркнуты вирусы, полученные от *C. rufocanus*.

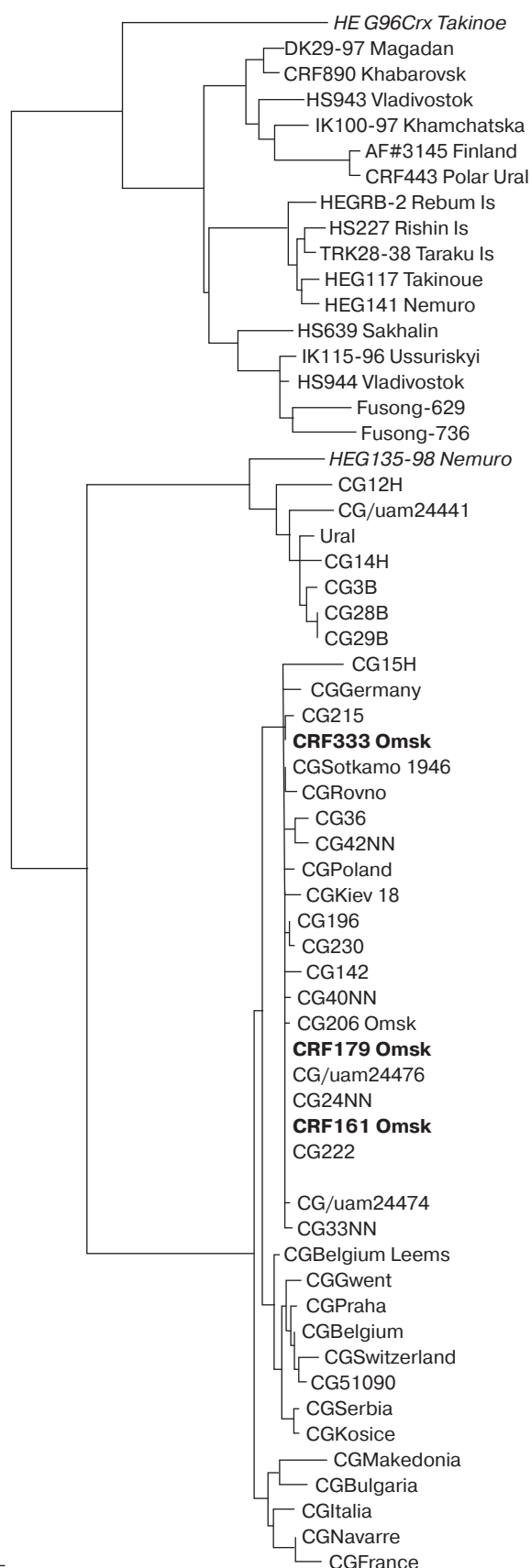


Рис. 2. Филогения, построенная по наиболее длинному (885 н.о.) общему фрагменту нуклеотидной последовательности цитохрома В митохондриального генома полевок *C. rufocanus* и *C. glareolus*. Использованы также последовательности *C. rex* и *C. rutilus*.

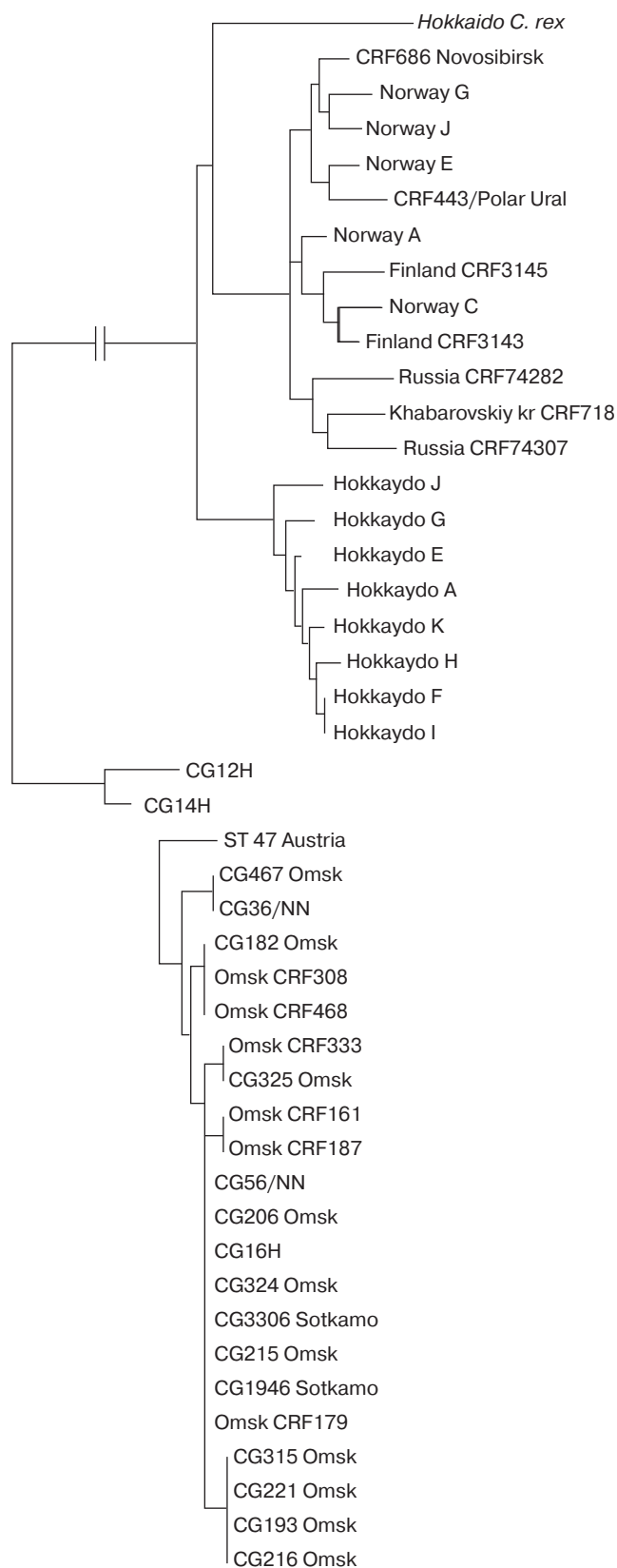


Рис. 3. Филогения, построенная по наиболее длинному (341 н.о.) общему фрагменту нуклеотидной последовательности легкой петли (L) митохондриального генома полевок *C. rufocanus* и *C. glareolus*. Использованы также последовательности *C. rex* и *C. rutilus*. В кластере, помеченном как «*C. glareolus* + *C. rufocanus*», последовательности от *C. rufocanus* включают в свое название буквы CRF.

в островных и горных областях Европы. Например, уровень гомологии в группе, включающей европейские последовательности (Македония, Болгария, Италия, Франция), ниже (97–98%), чем в группе из того же кластера, включающей последовательности из изолятов России, Украины и Польши (примерно 99%). Это может быть объяснено либо более ранним эволюционным расхождением, либо изолированностью популяций и невозможностью обмена генетическим материалом.

В митохондриальном геноме грызунов скорость замены нуклеотидов в 5–10 раз выше, чем в ядре, поэтому такая изменчивость позволяет проводить датировку эволюционно близких событий. Считается, что молекулярная эволюция митохондриальных генов хорошо объясняется эффективно-нейтральной теорией, о чем свидетельствуют результаты сравнительно-геномного анализа митохондрий млекопитающих [8].

Однако при анализе филогенетических отношений по митохондриальным последовательностям нужно учитывать, что путь эволюции митохондриального генома может отличаться от эволюции ядерного генома. По данным F. Ling et al. (2004), существуют специфические особенности наследования митохондрий. Например, обнаружен белок, который обеспечивает наследование только одной молекулы митохондриальной ДНК из всех содержащихся в эукариотической клетке животных. В раннем эмбриональном развитии млекопитающих яйцеклетки с мутантными митохондриями подвергаются апоптозу, как считают D.C. Krakauer et al. (1999), M. Perez et al. (2000), что, возможно, останавливает деградацию митохондрий.

К филогенетическому анализу, проведенному по митохондриальным последовательностям, следует подходить с известной долей осторожности, т.к. время дивергенции таксонов по последовательностям цитохрома В оказывается завышенным относительно данных по ядерным интронам примерно в 1,5 раза [3]. Причина противоречий в оценке данных, полученных при изучении митохондриальных и ядерных последовательностей на микроэволюционном уровне, может состоять в разной степени зависимости этих процессов от эффективной численности популяции для гаплоидных и диплоидных геномов.

Кроме того, время дивергенции генов и видов животных может не совпадать. Обычно дивергенция популяций происходит позднее, чем дивергенция генов, что иногда приводит к сохранению предкового полиморфизма у популяций с малым временем изоляции и у видов, испытавших «взрывную» эволюцию, например у полевок [1, 11]. Не совпадать может также и ветвление филогенетического дерева. Один и тот же ген (например, цитохрома В) эволюционирует с разной скоростью даже у очень близких таксонов, а разные гены дают очень разные оценки генетической дивергенции в силу различий в скоростях молекулярной эволюции [1]. Поэтому выводы, полученные в данной работе, требуют дальнейшего уточнения по

мере накопления данных о генетических различиях в геноме полевок и хантавирусов.

Эволюция вирусной РНК идет быстрее эволюции митохондриальных генов животных, что подтверждается сравнением построенных деревьев, например, финско-карельские последовательности вирусов Пуумала показывают уровень гомологии внутри своего кластера, примерно равный 93–94%, в то время как для последовательностей цитохрома В их хозяев *C. glareolus* уровень гомологии более 97% при сравнении между собой последовательностей большинства финских и российских изолятов. Путь эволюции вирусной РНК может отличаться от эволюции генома хозяев даже в случае хантавирусов, которые очень сильно связаны с хозяевами. Но датировка по вирусным филогениям может быть использована для выявления совсем недавних эволюционных событий. Например, уровень гомологии для использованных последовательностей цитохрома В (рис. 2) подродов *C. rufocanus* и *C. glareolus* из Западной Сибири и Финляндии (Sotkamo) превышает 99% и датировка по молекулярным часам для таких коротких фрагментов будет недостоверной, в то время как сравнение аналогичных по географическому положению вирусных последовательностей (рис. 1) дает значения уровня гомологии около 89–90%, что уже можно использовать для оценки времени расхождения в эволюции последовательностей [22]. Сравнительная генетические расстояния между ветвями деревьев и уровни гомологии между последовательностями не только внутри этих кластеров, но и между ними, можно прийти к выводу о возможности совсем недавнего «переключения» вирусов Пуумала с *C. glareolus* на *C. rufocanus* в Западной Сибири, где генетическая близость полевок этих подродов может объясняться данными палеонтологии об их длительном сосуществовании в перекрывающихся экологических нишах [5]. Причем событие это произошло совсем недавно, уже после расселения современного типа полевок *C. glareolus* по европейским и российским территориям. О возможности таких событий говорит информация об изменениях, происходящих с ландшафтами юга Западной Сибири за последние 300–400 лет на фоне колонизации русскими этой территории [6, 7]. Совпадение хозяйственной деятельности поселенцев (земледелие) с естественной гидрологической цикликой территории, по-видимому, привело к деградации обширных водно-болотных экосистем лесостепи Ишим-Иртышского междуречья и озерных комплексов степи (Чановская система).

В итоге на указанных территориях в значительной степени уменьшился уровень обводненности или заболоченности, что не могло не обеспечить их большую доступность для различных групп позвоночных. Вероятно, что изменение гидрологического режима лесостепи повлияло на прилегающие территории лесной зоны, что в конечном итоге могло способствовать изменениям границ ареала грызунов, в частности рыжей полевки.

Литература

1. Абрамсон Н.И. // Вестник ВОГиС. — 2007. — Т. 11, № 2. — С. 307–331.
2. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. — М.: Мир, 1988.
3. Банникова А.А. // Журн. общей биологии. — 2004. — Т. 65. — № 4. — С. 278–305.
4. Бородин А.В. // Современное состояние и история животного мира Западно-Сибирской низменности. — Свердловск, 1988. — С. 20–30.
5. Бородин А.В. // История современной фауны Южного Урала. — Свердловск, 1992. — С. 90–97.
6. Колесников А.Д. // Природа и природопользование на рубеже 21 века: материалы межрегион. науч.-практ. конф. — Омск, 1999. — С. 44–45.
7. Колесников А.Д. // Природа и природопользование на рубеже 21 века: материалы межрегион. науч.-практ. конф. — Омск, 1999. — С. 45–49.
8. Попадьян К.Ю. Эволюция бесполой линии: эколого-генетические механизмы происхождения и поддержания: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2005.
9. Conroy C.J., Cook J.A. // J. Mammal. Evol. — 1999. — No. 6. — P. 221–245.
10. Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A. et al. // Infect. Genet. Evol. — 2003. — Vol. 3, No. 4. — P. 245–257.
11. Edwards S.V., Beerli P. // Evolution. — 2000. — Vol. 54. — P. 1839–1854.
12. Fedorov V.B. // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. — 1999. — No. 266. — P. 621–626.
13. Fedorov V.B., Stenseth N.C. // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. — 2002. — No. 269. — P. 2071–2077.
14. Hughes A.L., Friedman R. // Mol. Biol. Evol. — 2000. — Vol. 17, No. 10. — P. 1558–1568.
15. Lopez J.V., Culver M., Stephens J.C. et al. // Mol. Biol. Evol. — 1997. — No. 14. — P. 277–286.
16. Martin Y., Gerlach E., Schlotter C., Meyer A. // Mol. Phylogen. Evol. — 2000. — Vol. 16. — P. 37–47.
17. Matson C.W., Baker R.J. // Mol. Biol. Evol. — 2001. — Vol. 18, No. 8. — P. 1494–1501.
18. Murphy W.J., Eizirik E., Johnson W.E. et al. // Nature. — 2001. — No. 409. — P. 614–618.
19. Plyusnin A. // Arch. Virol. — 2002. — Vol. 147. — P. 665–682.
20. Plyusnin A., Kukkonen K. J., Plyusnina A. et al. // EMBO J. — 2002. — Vol. 21, No. 6. — P. 1479–1503.
21. Sibold C., Meisel H., Kruger D.H. et al. // J. Virol. — 1999. — Vol. 73, No. 1. — P. 667–675.
22. Sironen T., Vaheri A., Plyusnin A. // J. Virol. — 2001. — Vol. 75, No. 23. — P. 11803–11810.
23. Tesakov A. // Acta Zool. Cracov. — 1996. — Vol. 39, No. 1. — P. 541–547.
24. Vapalahti O., Lundkvist A., Fedorov V. et al. // J. Virol. — 1999. — Vol. 73, No. 7. — P. 5586–5592.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

TO A QUESTION ON EVOLUTION OF THE HANTAVIRUS GENOTYPE PUUMALA

Z.S. Tyulko¹, V.V. Jakimenko²

¹Omsk state medical academy, ²Omsk scientific research institute of the natural infections Rospotrebnadzor

Summary — Puumala Hantavirus infection forms ten clusters, having relative geographical specificity. Stellate structure of trees assumes an old divergence of the given groups. In each group (except for Siberian) connection with one kind of rodents of owners is kept. Comparing intra- and intercluster genetic distances and levels of homology between sequences, it is possible to assume an opportunity of absolutely recent «switching» of viruses Puumala with Clethrionomys glareolus on Clethrionomys rufocanus in Western Siberia where the genetic affinity of these rodents can be caused by their long coexistence in overlapped ecological niches.

Key words: hantavirus, Puumala, mitochondrial gene, cytochrome B, phylogenia.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 27–32.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-002.151-022]-092.19

Н.Г. Плехова, Л.М. Сомова, Г.Г. Компанец, Р.А. Слонова

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

РОЛЬ КЛЕТОК МОНОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХАНТАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Ключевые слова: макрофаги, моноциты, хантавирус.

Приведены современные данные об участии клеток моноцитарного происхождения в патогенезе хантавирусных инфекций. Представлены доказательства, что восприимчивость моноцитарных клеток к хантавирусной инфекции возрастает при достижении ими последней стадии дифференцировки. В силу филогенетической однородности этих клеток данные, полученные при исследовании их взаимодействия с хантавирусами, можно экстраполировать на клетки моноцитарного происхождения класса млекопитающих. Указано, что хантавирусы резистентны к воздействию моноцитов/макрофагов и способны к внутриклеточной репродукции в них, преодолевая таким образом биологический барьер, препятствующий распространению возбудителя из первичного очага инфекции и защищающий от заражения чувствительные клетки различных органов.

Основным компонентом первого барьера защиты организма от инфекционных агентов являются клетки моноцитарного происхождения. При всем разнообразии, обусловленном степенью зрелости и различной тканевой специализацией, эти клетки связывают единство происхождения, сходство структуры, общность основных функций и метаболических процессов, обеспечивающих реализацию их функций. Известно, что к популяции моноцитов у человека относят клетки, несущие на своей поверхности специфичный рецептор — CD14 (Cluster of Differentiation), но на настоящий момент классификация этой популяции клеток расширена на основе дифференцированного подхода к степени выраженности рецептора

CD14 и дополнительного к нему — CD16 (FcγRIII) [29]. Субпопуляция моноцитов, имеющая высокую степень экспрессии рецептора (CD14^{hi}) и ее отсутствие (CD16⁻), описывается как «классические» моноциты, составляющие у здоровых взрослых людей 90–95% от общего числа моноцитов. Остальные 5–10% — так называемые «неклассические» или «провоспалительные» моноциты, которые положительны по экспрессии CD16 (CD14⁺, CD16⁺). Они больше по размерам, чем моноциты (CD14⁻), имеют большее количество гранул, экспрессируют рецепторы для воспалительных хемокинов CCR1, CCR2, CXCR1 и CXCR2, интенсивно продуцируют фактор некроза опухоли-α в ответ на стимуляторы (TLR4 and TLR2) и в значительно меньшей степени — интерлейкин-10 в ответ на специфический стимулятор TLR4 [7, 17]. Экспрессия специфических рецепторов для хемокинов и молекул адгезии очень важна при функциональном созревании клеток как в процессе миграции, так и при их восприимчивости к заражению [24]. Например, вирус синдрома иммунодефицита человека и вирус лихорадки западного Нила могут использовать этот тип рецепторов для избирательного инфицирования конкретной субпопуляции моноцитов [6, 10]. В течение воспаления и системной инфекции у человека количество «неклассических» моноцитов (CD14⁺, CD16⁺, CCR2⁻) эффективно увеличивается. Помимо специфичных для моноцитов на их мембране также имеются рецепторы, специфичные для каждого класса иммуноглобулинов (Fc) и для фракций активированного комплемента (CR1, CR3, CR4). При этом Fc-рецепторы опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность, имеющую определенное значение при вирусных инфекциях [21].

В отличие от промоноцитов и моноцитов на мембране зрелых макрофагов выявлены так называемые дифференцировочные антигены, количество которых нарастает по мере созревания клеток. Тем не менее обнаружена антигенная общность между мышинными макрофагами костно-мозгового происхождения и их перитонеальными макрофагами [1].

Макрофаги являются эффекторами и модуляторами различных воспалительных процессов, и вирулицидные свойства этих фагоцитов относятся к важным элементам устойчивости организма при многих вирусных инфекциях [16]. Причем различные вирусы могут проникать как в нативные, так и в стимулированные макрофаги, и источником инфекции в организме могут становиться и те фагоциты, которые являются непермиссивной системой для вируса. Так, было показано, что *in vitro* в макрофагах крыс вирус гриппа А быстро погибает [2]. Этот процесс связывают с нарушением синтеза вирусных полипептидов. В то же время, по данным K.L. Lin et al., перитонеальные макрофаги крыс, адсорбировавшие на своей мембране этот вирус, приобретали способность инфицировать монослой чувствительных к нему клеток конъюнктивы человека [14]. Заражение здесь обус-

ловлено освобождением патогенного агента, фиксированного на цитоплазматической мембране.

По своим свойствам противостоять макрофагальному воздействию вирусы подразделяются на две группы: одни легко инактивируются фагоцитами (группа I), а другие резистентны к их действию (группа II). Некоторые представители последней группы способны к активной и нередко длительной репродукции. Для вирусов, легко инактивируемых макрофагами, последние являются биологическим барьером, препятствующим распространению возбудителя из первичного очага инфекции и защищающим от заражения высокочувствительные клетки различных органов. В случае если размножающийся в макрофагах вирус обладает цитопатической активностью в отношении клеток жизненно важных органов, то обычно развивается острая инфекция, как правило, с летальным исходом. В тех случаях, когда вирус не вызывает деструкции макрофагов и других клеток хозяина, формируется персистентный тип инфекции.

В современной литературе потенциальные анти-вирусные функции макрофагов классифицируются как прямые и опосредованные. Прямая антивирусная активность определяется способностью макрофагов нарушать вирусную репликацию, и в таком случае макрофаг является невосприимчивой для вирусной репликации клеткой. Опосредованная антивирусная активность определяется способностью макрофага внеклеточно влиять на вирус, что препятствует его репликации в окружающих восприимчивых клетках. При этом отмечается, что при развитии некоторых вирусных инфекций активированный макрофаг приобретает способность различать инфицированные и интактные клетки [8]. Таким образом, значение моноцитов/макрофагов при вирусных инфекциях определяется их функциональным состоянием. С одной стороны, зараженные вирусом моноциты, взаимодействующие в первую очередь с инфекционным агентом, при их преобразовании в макрофаги могут служить источником данного возбудителя в различных органах организма. С другой стороны, для вирусов, инактивируемых макрофагами, эти клетки являются биологическим барьером, препятствующим распространению возбудителя из первичного очага инфекции, что защищает от дальнейшего заражения высокочувствительные клетки различных органов. Особенное значение приобретает вопрос моноцитарно-макрофагального воздействия именно в первые часы и сутки после заражения организма, причем необходимо учитывать, что конкретные механизмы активации этих клеток при различных вирусных инфекциях не идентичны и на данный момент находятся в стадии интенсивного изучения.

В настоящее время различными исследователями определено, что многие вирусы способны размножаться в моноцитах/макрофагах, в том числе возбудители геморрагических лихорадок (вирусы Денге, Хунин, Хантаан) [8, 22, 23], а также вирус клещевого

энцефалита. При этом функциональное состояние клеток макрофагального ряда оказывает влияние на развитие резистентности организма [3, 18, 26]. Немаловажно, что при размножении различных вирусов, в частности вирусов иммунодефицита человека в макрофагах, их цитопатическое воздействие на клетку морфологически не выявляется, но определяется снижением ее бактерицидного потенциала и синтезирующей активности. Это впоследствии может выражаться в реализации потенциала макрофагов как инициаторов иммунного ответа организма [20].

В современной вирусологии к хантавирусам относятся этиологические агенты двух тяжелых заболеваний человека: геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и хантавирусного легочного синдрома. Хантавирусы являются серологически родственными членами семейства *Bunyaviridae*. Это вирусы с отрицательным геномом РНК, разделенной на три сегмента — L, M и S, которые соответствуют вирусной транскриптазе, гликопротеинам и белкам нуклеокапсида. Первой стадией инфицирования является адгезия вирусных частиц к специфическим рецепторам на клеточной поверхности, а для проникновения в клетки-мишени хантавирус использует гликопротеины (интегрины), состоящие из различных комбинаций α - и β -цепей, наличие которых также отмечается на поверхности моноцитов/макрофагов [9, 11–13]. Также было установлено, что при заражении хантавирусом перевиваемой линии клеток ТНР-1, являющейся предшественником моноцитов, и первичной культуры моноцитов/макрофагов цитокин- и хемокинпродуцирующая активность последних оказывается выше. Эти данные указывают на повышенную способность более зрелых клеток к реакции в ответ на введение инфекта, что позволяет применять первичную культуру моноцитов/макрофагов как модель для изучения хантавирусной инфекции [16].

Необходимо отметить, что различные исследователи указывали на присутствие антигена хантавируса в моноцитах периферической крови человека и животных в острый период заболевания [15, 19, 22, 23]. При этом приводились противоречивые данные о репродукции вируса в этих клетках. Одни исследователи утверждали, что размножение хантавирусов в макрофагах ограничено и затрагивает только 10% клеток [27, 28], другие говорили о репродукции вируса в 100% клеток макрофагальных культур [19]. Тем не менее недостаточная изученность патогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом, одним из возбудителей которой является вирус *Hantaan*, определяет необходимость исследования взаимодействия его с клетками периферической крови, а именно с клеточными элементами фагоцитарного звена иммунитета — моноцитами/макрофагами. Несмотря на наличие в литературных источниках сведений о репродукции хантавируса в моноцитах/макрофагах, совершенно не исследован вопрос о локализации и месте его репродукции в этих клетках, а

также об их функциональном состоянии при развитии хантавирусной инфекции.

С целью сравнительного изучения способности моноцитов/макрофагов адсорбировать хантавирусы мы применяли первичные культуры клеток, невосприимчивых к геморрагической лихорадке с почечным синдромом животных — взрослых мышей и морских свинок. Так, мы использовали первичную культуру моноцитов крови, которую предварительно до заражения вирусами инкубировали в течение 18 часов и 6 суток, и популяцию перитонеальных клеток, которая включала в себя преимущественно макрофаги. По данным литературы предварительная инкубация в течение 3 суток соответствует окончанию периода созревания моноцитов в резидентные макрофаги, которое происходит в результате адгезии этих клеток к поверхности [25]. Таким образом, из разнородной популяции клеток перитонеального экссудата мы получали равноценные по функциональным свойствам резидентные макрофаги, которые впоследствии заражали хантавирусом. В качестве инфекционных агентов использовались различные по вирулентности штаммы: вирулентный для новорожденных мышей штамм ПМ-95, выделенный на клетках Vero E6 из суспензии легких инфицированной полевой мыши (*Apodemus agrarius*), и слабовирулентный для этих животных штамм ДВП. В культуру клеток вносили культуральную жидкость, содержащую не менее 10^{-2} ТКИД 50 в 0,2 мл, что составляло 5 инфекционных единиц на 1 макрофаг, исходя из посадочной концентрации клеток и количества титра вируса, используемого для заражения. Также, для исследования свойств макрофагов как фагоцитов, способных поглощать разрушенные клеточные элементы, мы вносили в эти клетки лизат клеточной культуры Vero E6, включающий хантавирус. Время контакта макрофагов с хантавирусом составляло от 15 до 60 мин, после чего монослой дважды промывали средой 199 для удаления внеклеточно расположенного антигена и продолжали инкубацию в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 и 48 часов. В пробах надосадочной жидкости после 15, 30 и 60 мин контакта с монослоем макрофагов определяли специфическую активность вируса путем титрования на клеточной культуре Vero E6.

В наших экспериментах с помощью метода флуоресцирующих антител, при внесении в первичную культуру моноцитов/макрофагов жидкости со слабовирулентным и вирулентным штаммами хантавируса, определена цитоплазматическая локализация специфического антигена. При этом помимо наружной цитоплазматической мембраны антиген выявлялся в перинуклеарном пространстве цитоплазмы макрофагов. Необходимо отметить изменение количества антигенсодержащих клеток в зависимости от сроков инкубации: повышение их числа через 15 мин и 4 часа инкубации и снижение через 2 и 3 часа. Доля таких клеток при внесении вирусосодержащей жидкости с вирулентным штаммом хантавируса составила

53,5±4,6, 49,0±2,8, 36,0±7,1 и 24,0±1,8% соответственно. Для макрофагов, зараженных слабовирулентным штаммом хантавируса, динамика количества антигенсодержащих клеток находилась в подобной зависимости от времени инкубации. Через 24 часа после заражения доля таких клеток как в одном, так и другом случае снижалась до 18,0±1,6%.

При титровании вирусосодержащей жидкости до заражения и в последующие периоды инкубации было установлено снижение титра ТКИД 50/0,2 мл в опытных пробах на 2,0 lg через 15, 30 и 60 мин контакта. Это свидетельствовало об активной адсорбции вируса на поверхности макрофагальных клеток уже после 15 мин контакта. При морфологическом исследовании макрофагов с увеличением времени контакта выявлялись клетки с признаками деградации. К ним относилось появление в периферической зоне цитоплазмы макрофагов большого количества вакуолей, в результате чего она приобретала пенистый вид. Мы пришли к заключению, что время контакта монослоя клеток с вирусосодержащей жидкостью необходимо сокращать до 15 мин для того, чтобы исключить цитопатическое воздействие хантавируса на культуру.

При сравнении динамики накопления специфического антигена в первичных культурах резидентных макрофагов, полученных от мышей и морских свинок, было выявлено статистически недостоверное различие в количестве антигенсодержащих клеток. Результаты этого исследования указывают на способность хантавируса в одинаковой степени заражать популяцию макрофагальных клеток, независимо от их принадлежности к различным видам животных.

Интерес представляют данные о динамике накопления специфического антигена в популяции моноцитов крови животных в зависимости от времени предварительной, до заражения вирусом, инкубации клеток. В случае заражения моноцитов без предварительной инкубации отмечался низкий процент антигенсодержащих клеток, тогда как после предварительной инкубации этих моноцитов в течение 18 часов количество подобных клеток возрастало, а после 6 суток достигало максимальных цифр. Так, через 15 мин после заражения хантавирусом доля антигенсодержащих клеток в популяции моноцитов без предварительной инкубации составляла 2,0±0,6%, при инкубации монослоя клеток в течение 18 часов до инфицирования — 35,0±1,7% и при инкубации в течение 6 суток — 52,3±3,2%.

Таким образом, восприимчивость моноцитарных клеток к хантавирусной инфекции возрастает при достижении ими последней стадии дифференцировки. Использование в качестве модельной системы первичной культуры макрофагов перитонеального экссудата животных без применения каких-либо индукторов воспаления позволяет получить равноценную по восприимчивости к хантавирусной инфекции популяцию резидентных кле-

ток. В силу филогенетической однородности этих клеток [1] данные, полученные при исследовании их взаимодействия с вирусами, можно экстраполировать на клетки моноцитарного происхождения класса млекопитающих. Подобные результаты были получены другими исследователями при заражении хантавирусом перевиваемой линии клеток ТНР-1, являющейся предшественником моноцитов, и моноцитов/макрофагов первичной культуры [16]. В последнем случае цитокин- и хемокинпродуцирующая активность клеток после их инфицирования хантавирусом была выше. По мнению авторов, эти данные указывает на повышенную способность более зрелых клеток к реакции в ответ на введение инфекта, что позволяет применять первичную культуру моноцитов/макрофагов как модель для изучения хантавирусной инфекции.

В России большое значение в развитии исследований, направленных на выяснение роли клеток моноцитарно-макрофагальной системы в патогенезе вирусных инфекций, имели работы школы А.А. Смородинцева [4]. Была продемонстрирована инертность фагоцитирующих клеток в отношении свободных вирионов осповакцины, герпеса, гриппа и экстремелии и была доказана способность этих клеток поглощать вирусные частицы только в том случае, когда они входят в состав зараженных структурных компонентов клеток хозяина или адсорбированы на его клеточных элементах (например, на эритроцитах) [5]. Результаты, полученные исследователями, позволили сформулировать концепцию противовирусного иммунитета, согласно которой эффекторные клетки способны взаимодействовать с вирусом только в случае его ассоциации со структурами или молекулами зараженного организма. Нами установлено, что после контакта макрофагов с лизатом клеточной культуры Vero E6, включающей хантавирус, было выявлено меньшее количество антигенсодержащих клеток, чем при внесении в монослой фагоцитов вирусосодержащей жидкости. Количество таких клеток при внесении лизата через 15 мин после инфицирования составило 34,0±2,8%. В этот период на поверхности и в цитоплазме макрофагов наблюдались крупные антигенспецифические включения, по-видимому относящиеся к участкам лизированных клеток, содержащих хантавирус. С течением времени, после 3 часов инкубации, определялось резкое снижение количества антигенсодержащих фагоцитов (до 4,5±1,8%), которое происходило в результате деградации клеточной культуры. Морфологически это проявлялось в просветлении цитоплазмы, появлении крупных вакуолей, секвестрации отдельных участков цитоплазмы и округлении ядра клеток. На наш взгляд, способность клеток моноцитарной линии адсорбировать из вирусосодержащей жидкости на своей поверхности хантавирус указывают на иную, чем по мнению А.А. Смородинцева и других исследователей [2, 4], роль этих клеток в патогенезе инфекции.

По нашему мнению, при заражении организма хантавирусом участие макрофагов не ограничивается ролью «профессиональных фагоцитов», в результате избирательной адсорбции вируса эти клетки могут выступать в качестве мишеней для его репродукции. В этом случае моноциты/макрофаги на начальном этапе заболевания способны инициировать иммунный ответ организма.

Таким образом, при исследовании патогенеза хантавирусных инфекций к важному и нерешенному вопросу относится определение мест кодирования главных детерминант вирусов в начальный период заболевания. Это включает: 1) выявление локализации рецепторов, используемых вирусами для адгезии на поверхность клеток; 2) обнаружение типа клеток, поддерживающих первичное размножение вирусов; 3) раскрытие механизма тропизма данных вирусов к различным тканям. В свете решения данного вопроса значение клеток моноцитарно-макрофагальной системы в патогенезе хантавирусных инфекций приобретает особенный смысл, который усиливается фактом повсеместного распространения этих клеток в организме человека. Причем хантавирусы относятся к той группе вирусов, которая резистентна к действию макрофагов и способна к внутриклеточной репродукции в них, преодолевая таким образом биологический барьер, препятствующий распространению возбудителя из первичного очага инфекции и защищающий от заражения чувствительные клетки различных органов. Необходимо также учитывать, что источником инфекции в организме могут стать и те макрофаги, которые являются непермиссивной системой для хантавирусов, потому что с адсорбированным на мембране вирусом эти фагоциты могут быть источником его дальнейшего распространения.

Литература

1. Купер Э. Сравнительная иммунология. — М.: Мир, 1980.
2. Семенов Б.Ф., Каулен Д.Р., Баландин И.Г. Клеточные и молекулярные основы противовирусного иммунитета. — М.: Медицина, 1982.
3. Скрипченко А.А. // *Терапевтический архив*. — 1997. — № 3. — С. 214–217.
4. Смородинцев А.А. Основы противовирусного иммунитета. — М.: Медицина, 1975.
5. Смородинцев А.А. // *Вопр. вирусол.* — 1983. — № 2. — С. 12–16.
6. Amara A., Vidy A., Boulla G. et al. // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77, No. 4. — P. 2550–2558.
7. Belge K.U., Dayyani F., Horelt A., et al. // *J. Immunol.* — 2002. — Vol. 168. — P. 3536–3542.
8. Cosgriff T. M. // *Rev. Inf. Dis.* — 1991. — Vol. 13. — P. 97–107.
9. Gavrilovskaya I.N., Brown E.J., Ginsberg M.H., Mackow E. R. // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73, No. 5. — P. 3951–3959.
10. Glass W.G., Lim J.K., Cholera R. et al. // *J. Exp. Med.* — 2005. — Vol. 202. — P. 1087–1098.
11. Helmy K.Y., Katschke K.J., Gorgani N.N. et al. // *Cell.* — 2006. — Vol. 124. — P. 915–927.
12. Hynes R. // *Cell.* — 1992. — Vol. 69. — P. 11–25.
13. Jin M., Park J., Lee S. et al. // *Virol.* — 2002. — Vol. 294, No. 1. — P. 60–69.
14. Lin K.L., Suzuki Y., Nakano H. et al. // *J. Immunol.* — 2008. — Vol. 180, No. 4. — P. 2562–2572.
15. Marcotic A., Rabatic S., Gagro A. et al. // *Hantaviral and arenal diseases / eds. Saluzzo J.F., Dodet B., Elsevier.* — Elsevier: SAS, 1999. — P. 3–13.
16. Markotic A., Hensley L., Daddario K. et al. // *Coll. Antropol.* — 2007. — Vol. 31, N 4. — P. 1159–1167.
17. Mizuno K., Toma T., Tsukiji H. et al. // *Clin. Exp. Immunol.* — 2005. — Vol. 142. — P. 461–470.
18. Mogensen S.C. // *The Reticuloendothelial System: A Comprehensive Treatise.* — London, 1988. — Vol. 10. — P. 207–210.
19. Nagai T., Tanishita O., Takahashi Y. et al. // *J. Gen. Virol.* — 1985. — Vol. 66. — P. 1271–1278.
20. Schrier R.D., McCutchan J.A., Wiley C.A. // *J. Virol.* — 1993. — Vol. 67, No. 10. — P. 5713–5720.
21. Strauss-Ayali D., Sean M.C., Mosser D.M. // *J. Leukoc. Biol.* — 2007. — Vol. 82. — P. 244–252.
22. Temonen M., Vapalahti O., Holthofer H. et al. // *J. Gen. Virol.* — 1993. — Vol. 74. — P. 515–518.
23. Temonen M., Lankinen H., Vapalahti O. et al. // *Virol.* — 1994. — Vol. 206. — P. 8–15.
24. Theodorou I., Combadiere C. // *Science* — 2000. — Vol. 287. — P. 2274–2277.
25. Waldo S.W., Li Y., Buono C., Zhao B. et al. // *Am. J. Pathol.* — 2008. — Vol. 172, No. 4. — P. 1112–1126.
26. Wu L., Morahan P.S. // *Curr. Topics in Microbiol.* — 1992. — Vol. 179. — P. 89–110.
27. Yao J.S., Kariwa H., Takashima I. et al. // *Arch. Virol.* — 1992. — Vol. 122, No. 1–2. — P. 107–118.
28. Yao J.S., Arikawa J., Kariwa H. et al. // *Jpn. J. Vet. Res.* — 1992. — Vol. 40, No. 2–3. — P. 87–97.
29. Ziegler-Heitbrock H.W. // *J. Leukoc. Biol.* — 2000. — Vol. 67. — P. 603–606.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

ROLE OF MONOCYTE CELLS IN PATHOGENESIS OF THE HANTAVIRAL INFECTION

N.G. Plehova, L.M. Somova, G.G. Kompanets, R.A. Slonova
Scientific research institute of epidemiology and microbiology
of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science
(Vladivostok)

Summary — The modern data on participation of monocytes in pathogenesis of hantavirus infection are resulted. Proofs are submitted, that the susceptibility of monocytes to Hantavirus grows at last stage of a differentiation. By virtue of phylogenetic uniformity of these cells, the data received at research of their interaction with hantavirus, it is possible to extrapolate on monocytes of the mammal class. It is specified, that hantavirus resistant to influence of the monocytes and capable to an endocellular reproduction in them, breaking thus the biological barrier interfering distribution of the activator from the primary center of an infection and protecting sensitive cells of various organs.

Key words: macrophages, monocytes, hantavirus.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 32–36.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-085.371/.372

О.В. Чубукова, Ю.М. Никоноров

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (г. Уфа)

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДНК-ВАКЦИН В ПРОФИЛАКТИКЕ ХАНТАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Ключевые слова: хантавирусы, ДНК-вакцины, иммунный ответ.

Метод ДНК-вакцинации основан на введении в организм плазмидной ДНК, кодирующей белок патогена. Такой подход позволяет получить полный иммунный ответ к различным бактериальным и вирусным антигенам. В данном обзоре рассматриваются перспективы создания ДНК-вакцины на основе структурных генов вируса – возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом, а также проблемы, возникающие при создании таких вакцин.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – широко распространенное в странах Евразии вирусное природно-очаговое заболевание. Возбудителями ГЛПС являются РНК-содержащие вирусы, относящиеся к семейству Буньявириде (*Bunyaviridae*) рода Хантавирус (*Hantavirus*). В конце XX века в мире ежегодно регистрировалось более 150 тыс. случаев ГЛПС, вызванных хантавирусами, причем летальность от данного заболевания в разные годы составляла от 1 до 22% [24]. Проблема хантавирусных инфекций актуальна и для России, на территории которой находятся крупные эпидемические очаги ГЛПС [2].

В настоящее время отсутствуют эффективные специфические средства для профилактики и лечения ГЛПС. Лицензированные промышленные вакцины, существующие на сегодняшний день, созданы на основе вирусов серотипов Хантаан (*Hantaan*) и Сеул (*Seoul*), циркулирующих преимущественно в странах Азии – Китае и Южной Корее. Однако по результатам клинических исследований эти вакцинные препараты оказались неспособны индуцировать устойчивый специфический иммунитет у людей и могут быть рекомендованы только для лиц, чья профессиональная деятельность сопряжена с кратковременным пребыванием в эпидемиологически неблагополучной местности. Только у 50% реципиентов, иммунизированных инаktivированными хантавирусными вакцинами (Хантавакс и комбинированная вакцина Хантаан-Пуумала), через год после последней инъекции были выявлены специфические нейтрализующие антитела [6].

В России подобные вакцины отсутствуют или только разрабатываются, а применение в профилактических целях вышеуказанных препаратов может оказаться малоэффективным, поскольку основным этиологическим агентом, вызывающим ГЛПС на территории нашей страны, является вирус серотипа Пуумала (*Puumala*), а в последнее десятилетие актуальность приобрел вирус Добрава (*Dobrava*) [2].

Проблемы, сопровождающие процесс создания вакцин против хантавирусных инфекций по традиционной технологии, а также зачастую их недостаточная эффективность способствуют поиску альтер-

нативных методов для разработки новых вакцинных препаратов. Одним из таких методов является ДНК-иммунизация.

ДНК-вакцины представляют собой сравнительно новый тип вакцин, принцип применения которых заключается в том, что в организм вводят ДНК (или РНК), кодирующую гены белков, к которым необходимо получить иммунный ответ.

Первая работа, сообщавшая о ДНК-вакцинации, появилась в 1990 г. [28]. В 1992–1993 гг. независимые группы исследователей впервые продемонстрировали, что ДНК-вакцинация вызывает у мышей полноценный иммунный ответ, т.е. образуются специфические антитела (гуморальный ответ) и цитотоксичные Т-лимфоциты (клеточный ответ) [25].

Для получения ДНК-вакцины требуется встроить ген, кодирующий интересующий белок, в специальный плазмидный вектор, трансформировать полученной конструкцией бактериальные клетки и затем выделить из них плазмидную ДНК. Очищенная ДНК и служит вакциной. Плазмида, введенная в эукариотический организм, оказывается неспособной к репликации (поскольку не несет эукариотической точки инициации репликации), но длительное время (более года) существует в ядре клетки в виде episome, не встраиваясь в геном, и поддерживает синтез кодируемых ею белков в течение недель или месяцев. Это явление получило название временной или транзиторной экспрессии [10, 14].

На данный момент можно считать доказанным тот факт, что ДНК-вакцинация является эффективным способом выработки как гуморального, так и клеточного иммунного ответа против широкого диапазона вирусных, бактериальных и паразитических антигенов в различных животных моделях [10, 14, 18].

Спектр методов доставки ДНК при генетической иммунизации довольно широк. Наиболее простым и распространенным является внутримышечная или подкожная инъекция ДНК на физиологическом растворе [1]. Особую популярность получил метод введения в клетку-мишень ДНК, зафиксированной на микроскопических золотых гранулах с помощью «генного ружья» [10]. Кроме того, в литературе упоминаются: интраназальная доставка, доставка ДНК в липосомах, полимерных частицах, биodeградирующих микрочастицах, сорбированной на наночастицы, электропорация *in vivo* [18, 21].

В настоящее время большинство используемых лицензированных вакцин, за исключением живых аттенуированных, индуцируют преимущественно

гуморальный иммунный ответ. Это обусловлено тем, что при вакцинации традиционными вакцинами антиген поступает в организм экзогенно в больших количествах и существует в нем в неизменном виде сравнительно недолго. При этом введенный антиген улавливается антигенпредставляющими клетками, в лизосомах которых гидролизуются до пептидов. Далее они связываются с белками главного комплекса гистосовместимости класса II. Образовавшийся зрелый комплекс презентуется на поверхности антигенпредставляющих клеток Т-хелперным лимфоцитам типа CD4+. Таким образом, обычная вакцинация сопровождается Т-хелперным ответом 2-го типа, который характеризуется выработкой Т-хелперами интерлейкинов 4, 5, 6 и 10, продукцией плазматическими клетками иммуноглобулинов G1 и E, активацией эозинофилов [1].

При ДНК-вакцинации иммуногенный белок синтезируется клетками самого организма в нативной форме, в небольших количествах и в течение довольно длительного времени. Синтезированный эндогенно антиген гидролизуются в цитозоле антигенпредставляющих клеток. Образовавшиеся короткие пептиды переносятся в эндоплазматический ретикулум, где связываются с молекулами класса главного комплекса гистосовместимости класса I и затем транспортируются к клеточной поверхности для распознавания Т-лимфоцитами типа CD8+. В свою очередь Т-лимфоциты организуют иммунный ответ, стимулируя выработку антител В-клетками, клональную экспансию цитотоксических Т-лимфоцитов и активируя макрофаги-киллеры [1]. В результате ДНК-иммунизации формируется преимущественно Т-хелперный ответ 1-го типа, который заключается в синтезе γ -интерферона и интерлейкина-2. Конечным итогом иммунного ответа здесь является образование активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, продукция плазматическими клетками антител класса иммуноглобулинов G2a и G2b, активация макрофагов [22]. Особенно важно, что, используя тот или иной способ доставки ДНК, можно изменять тип иммунного ответа. Так, например, внутримышечное введение индуцирует преимущественно Т-хелперный ответ 1-го типа, тогда как иммунизация «генным ружьем» индуцирует доминирующую реакцию Т-хелперов 2-го типа [1].

В идеале однократное введение ДНК-вакцины должно вызывать устойчивый сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ. В настоящее время наибольшие успехи достигнуты при генетической иммунизации грызунов, тогда как у крупных животных и людей ДНК-вакцины вызывают слабый или неустойчивый ответ даже после многократного введения больших доз ДНК [3, 10]. Для решения этой проблемы разрабатываются различные стратегии. Одной из них является повышение эффективности трансфекции клеток за счет оптимизации системы доставки [18]. Другой подход заключается во включении в векторную ДНК последовательностей, которые усиливают межклеточный транспорт антигена к

антигенпредставляющим клеткам и эффективность презентации его Т-лимфоцитам [19]. Иммуногенность ДНК-вакцин повышают за счет усиления экспрессии целевого гена, введения в плазмиду последовательностей, обладающих иммуностимулирующим эффектом – CpG-повторов, цитокинов [14, 17].

Основные опасения по применению описываемых вакцин связаны с возможностью неконтролируемого встраивания вводимой ДНК в те или иные участки генома, что может привести к нарушению функций любых генов. Однако в экспериментах по генетической иммунизации грызунов введенная ДНК не обнаруживалась в препаратах хромосомной ДНК [1, 8].

Известно, что при хантавирусной инфекции иммунный ответ вызывают вирусные гликопротеины G1 и G2, а также нуклеокапсидный (N) вирусный белок, но роль каждого из указанных антигенов в индукции защитного иммунитета против ГЛПС до сих пор не уточнена. Белок N хантавирусов является основным иммунным антигеном при ГЛПС, индуцируя ранний долговременный иммунный ответ [27]. Однако N-специфические антитела не обладают нейтрализующей активностью [20]. Тем не менее в ряде работ было показано, что пассивный перенос N-специфических антител, иммунизация рекомбинантным белком N вируса Хантаан, синтезированным в культуре клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом, а также химерными частицами вируса гепатита В, несущими концевой аминокислотный участок белка N вируса серотипа Пуумала, частично защищали иммунизированных животных от последующего заражения патогенным хантавирусом [23, 26]. Вирусные гликопротеины являются основными индукторами защитного гуморального иммунного ответа при ГЛПС: пассивный перенос нейтрализующих G1- и G2-специфических антител способен защитить лабораторных животных от хантавирусной инфекции [23].

В последние годы активно проводятся эксперименты по ДНК-иммунизации животных плазмидными конструкциями, несущими структурные гены различных патогенных хантавирусов.

Наиболее длительная и продолжающаяся в настоящее время серия экспериментов по созданию прототипов ДНК-вакцин для профилактики и лечения ГЛПС была начата J.W. Hooper et al. [11]. В первоначальном исследовании иммунизация мышей и хомяков плазмидой pWRG/SEO-M, несущей ген полипротеина вируса Сеул, индуцировала у животных синтез нейтрализующих G1- и G2-специфических антител и защищала их от заражения вирусами Сеул и Хантаан. В то же время плазида pWRG/-S, несущая ген нуклеокапсидного белка вируса Сеул, оказалась неиммуногенной для животных.

В последующих работах исследовалась эффективность ДНК-иммунизации лабораторных животных плазмидами, на основе ранее использованного вектора pWRG, несущего гены гликопротеинов хантавирусов, вызывающих ГЛПС и геморрагическую

лихорадку с легочным синдромом: Сеул, Хантаан и серотипа Андес — pWRG/SEO-M, pWRG/HTN-M и pWRG/AND-M соответственно. По данным авторов все конструкции успешно индуцировали длительный гуморальный иммунный ответ у макак-резусов [9, 15]. Нейтрализующие G1- и G2-специфические антитела, полученные из сыворотки животных, иммунизированных pWRG/SEO-M и pWRG/HTN-M, обладали перекрестной реактивностью к вирусу серотипа Добрава, но таковая отсутствовала в отношении вируса Пуумала. Эти данные находятся в полном соответствии с результатами исследований по перекрестной реактивности антител из сыворотки больных, инфицированных вирусами Сеул, Хантаан, Добрава, Пуумала [7]. В ряде экспериментов было показано, что пассивная иммунизация хомячков, зараженных вирусом Андес, специфическими нейтрализующими G1- и G2-антителами, полученными при ДНК-вакцинации приматов плазмидой pWRG/AND-M, полностью подавляла развитие летальной инфекции или увеличивала продолжительность жизни инфицированных животных [12, 13].

В работе М. Bharadwaj et al. [4] мелкие грызуны *Peromyscus maniculatus* (олений хомячок), иммунизированные плазмидами, кодирующими различные антигенные детерминанты гликопротеинов G1 и G2 и полноразмерный белок N вируса серотипа Син Номбре (Sin Nombre), были защищены с эффективностью 75–100% от заражения соответствующим хантавирусом. В данном исследовании авторы предполагали, что защитный эффект плазмидных ДНК обусловлен индукцией клеточного звена иммунитета, поскольку вирусспецифические антитела в иммунизированных животных не обладали нейтрализующей активностью.

В работе G. Woo et al. [29] из Южной Кореи показано, что введение плазмиды, несущей ген белка N вируса Хантаан, лабораторным мышам (линия C57BL/6) индуцировала у последних гуморальный ответ и образование N-специфических CD8⁺ клеток, в том числе N-CD8⁺ клеток памяти. Таким образом, заражение иммунизированных животных рекомбинантным вирусом, экспрессирующим белок N вируса Хантаан, приводило к формированию устойчивого CD8⁺ ответа против него.

Роль белка N в формировании защитного иммунного ответа на хантавирусную инфекцию не ясна. При иммунизации животных ДНК-конструкциями, кодирующими данный белок, был отмечен протективный эффект в отношении некоторых хантавирусов и показана индукция Т-клеточного ответа, хотя, как уже упоминалось, не происходило формирования защитного гуморального ответа. Однако в работе G. Bucht et al. [5] было отмечено, что плазмиды, содержащие ген нуклеокапсидного белка N, не обладают в полной мере защитной активностью при заражении животных диким штаммом вируса Пуумала (серотип Казань).

Как уже упоминалось, существуют подходы, позволяющие повысить эффективность ДНК-вакцина-

ции. В вышеупомянутой работе G. Bucht et al. [5] было показано, что иммунизация грызунов ДНК-конструкцией, кодирующей секретируемую форму белка N вируса серотипа Пуумала, защищала часть животных от заражения соответствующим хантавирусом в отличие от мышей, иммунизированных конструкциями, кодирующими трансмембранную и внеклеточные формы N-белка, которые оказались совершенно неэффективными. В исследовании J. Li et al. [16] показано использование белка теплового шока HSP70 в качестве адъюванта для ДНК-вакцины. Введение мышам плазмиды, экспрессирующей гены белка HSP70 и белка N вируса Хантаан, значительно усилило специфический гуморальный и клеточный ответ в сравнении с иммунизацией ДНК-конструкцией, содержащей только S-сегмент хантавируса. Усиление иммуногенности ДНК плазмиды, содержащей ген белка N, было достигнуто при совместном ее применении с плазмидой, экспрессирующей ген интерлейкина-12, в экспериментах на лабораторных мышках линии BALB/c [30].

Таким образом, исходя из анализа имеющейся литературы, можно заключить, что ДНК-вакцинация лабораторных животных (преимущественно мелких грызунов) конструкциями, кодирующими структурные гены патогенных хантавирусов, приводит к индукции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Однако эти результаты должны найти всестороннее подтверждение в экспериментах с привлечением высших животных, в том числе и приматов, для того чтобы служить основанием для осуществления проектов по созданию ДНК-вакцин против хантавирусных инфекций. Генетически неоднородные популяции людей являются весьма сложным объектом и при разработке обычных вакцин вследствие гендерных и возрастных различий, а результативность вакцинации часто оказывается ниже ожидаемой. Большое число последовательных этапов реализации генетической информации, содержащейся в ДНК рекомбинантной плазмиды, может привести к возрастанию роли индивидуальных особенностей конкретного организма при индукции иммунного ответа на ДНК-вакцинацию. А опасность таких последствий, как злокачественная трансформация, индукция апоптоза, аутоиммунные реакции, потенциально связанных с введением чужеродной ДНК в клетку, сдерживает оптимизм в отношении разработки и широкого применения ДНК-вакцин в ближайшие десятилетия.

Литература

1. Дебабов В. Г. // Молекуляр. биол. — 1997. — Т. 31. — С. 209–215.
2. Ткаченко Е. А., Окулова Н. М., Юничева Ю. В. и др. // Вopr. вирусол. — 2005. — Т. 50, № 3. — С. 14–19.
3. Babiuk I., Pontarollo R., Babiuk S. et al. // Vaccine. — 2003. — Vol. 21. — P. 649–648.
4. Bharadwaj M., Mirowsky K., Hy C. et al. // J. Gen. Virol. — 2002. — Vol. 83. — P. 1745–1751.

5. Bucht G., Sjolander K., Eriksson S. et al. // *Vaccine*. — 2001. — Vol. 19. — P. 3820–3829.
6. Cho H., Howard C., Lee H. // *Intervirology*. — 2002. — Vol. 24. — P. 328–333.
7. Chu Y., Jennings G., Schmaljohn C. et al. // *J. Infect. Dis.* — 1995. — Vol. 172. — P. 1581–1584.
8. Coelho-Castelo A., Trombone A., Rosada R. et al. // *Genet. Vaccines Therapy*. — 2006. — Vol. 4, No. 1. — P. 1–10.
9. Custer D., Thompson E., Schmaljohn C. et al. // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77. — P. 9894–9905.
10. Donnelly J., Ulmer J., Shiver J., et al. // *Annu. Rev. Immunol.* — 1997. — Vol. 15. — P. 617–648.
11. Hooper J., Kamrud K., Eigh F., et al. // *Virology*. — 1999. — Vol. 255. — P. 269–278.
12. Hooper J., Custer D., Smith J. et al. // *Virology*. — 2006. — Vol. 347. — P. 208–216.
13. Hooper J.W., Ferro A.M., Wahl-Jensen V. // *J. Virol.* — 2008. — Vol. 82. — P. 1332–1338.
14. Ivory C., Chadee K. // *Genet. Vaccines Ther.* — 2004. — Vol. 2. — P. 17–45.
15. Kamrud K., Hooper J., Eigh F. et al. // *Virology*. — 1999. — Vol. 2634. — P. 209–219.
16. Li J., Hy Z., Li K. et al. // *Vaccine*. — 2007. — Vol. 25. — P. 239–252.
17. Liu L., Zhou X., Liu H. et al. // *Immunology*. — 2005. — Vol. 225. — P. 223–230.
18. Luckay A., Maninder K.S., Kjekken R.S. et al. // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81. — P. 5257–5269.
19. Mwangi W., Brown W., Splitter G. et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* — 2007. — Vol. 14. — P. 304–311.
20. Nicacio C., Sallberg M., Hultgren C. et al. // *J. Gen. Virol.* — 2001. — Vol. 82. — P. 129–138.
21. O'Hagan D., Singh M., Dong C. et al. // *Vaccine*. — 2004. — Vol. 23, No. 5. — P. 672–680.
22. Robinson H.L. // *Vaccine* — 1997. — Vol. 15, No. 8. — P. 785–787.
23. Schmaljohn C., Chu Y., Schmaljohn A. et al. // *J. Virol.* — 1990. — Vol. 64. — P. 3162–3170.
24. Schmaljohn C., Hjelle B. // *Emerg. Infect. Dis.* — 1997. — Vol. 3, No. 2. — P. 95–104.
25. Tang D. C., Devit M., Jonston S. A. // *Nature*. — 1992. — Vol. 356. — P. 152–154.
26. Ulrich R., Lundkvist A., Meisel H. et al. // *Vaccine*. — 1998. — Vol. 16. — P. 272–280.
27. Vapalahti O., Kallio-Kokko H., Narvanen A. et al. // *J. Med. Virol.* — 1995. — Vol. 46. — P. 293–303.
28. Wolff J. A., Malone R. W., Williams P. et al. // *Science*. — 1990. — Vol. 247. — P. 1465–1468.
29. Woo G., Chun E.-Y., Kim K. // *J. Microbiol.* — 2005. — Vol. 43. — P. 537–545.
30. Zheng L., Mou L., Lin S. et al. // *Chin. Med. J.* — 2005. — Vol. 118, No. 4. — P. 313–319.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

PERSPECTIVES OF DNA-VACCINES APPLICATION FOR HANTAVIRAL INFECTIONS PREVENTION

O.V. Chubukova, Yu.M. Nikonorov

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences

Summary — DNA-vaccination methods are based on the introduction of plasmid DNA encoding the pathogen's protein to organism. This approach allows obtaining the complete immune response to different bacterial and viral antigens. At the review, perspective is considering of DNA-vaccine creation on the base of HFRS-exciting structural genes, and problems following such a vaccines creation are emphasized.

Key words: hantaviruses, DNA-vaccine, immune response.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 3, p. 37–40.

УДК 616.981.455+616.986.7+578.833.29](571.63)

А.В. Алленов¹, В.П. Борзов¹, В.Н. Краснощекоев¹, Н.А. Боровская², Т.В. Кушнарева³, В.Ю. Киряков⁴

¹Приморская противочумная станция Роспотребнадзора (г. Владивосток), ²Владивостокский государственный медицинский университет, ³НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток), ⁴Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю (г. Владивосток)

СОЧЕТАННОСТЬ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТУЛЯРЕМИИ, ЛЕПТОСПИРОЗА И ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ЭКОСИСТЕМАХ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Ключевые слова: туляремия, лептоспироз, хантавирусы, сочетанные очаги.

Представлены данные о сочетаемости природных очагов туляремии, лептоспироза и хантавирусной инфекции и дана их характеристика. По ландшафтно-географическим характеристикам очаги принадлежат к пойменно-болотному и лугополевому типам. Циркуляцию возбудителей инфекций обеспечивают в основном мышевидные грызуны двух видов — полевая мышь и дальневосточная полевка. Наличие всех трех нозологических форм чаще встречается в пойменно-болотном типе очагов и реже — в лугополевом.

Существование сочетанных очагов природно-очаговых инфекций установлено в Приморском крае в 70-х годах прошлого века при проведении эпизоото-

логического обследования на туляремию. В процессе изучения природных очагов туляремии использовался комплексный подход, направленный на установление наличия возбудителей других инфекций, таких как клещевой энцефалит, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), риккетсиоз, листериоз, лептоспирозы, иерсиниоз, клещевой боррелиоз и пастереллез [4]. В результате исследований, проведенных в последние годы в Приморском крае, было получено подтверждение существования и функционирования на его территории природных очагов туляремии, лептоспироза и хантавирусной инфекции,

Таблица 1

Заболеваемость зооантропонозными инфекциями в Приморском крае в сравнении с показателями Российской Федерации

Нозология	Территория		Заболеваемость по годам							
			2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Лептоспироз	Приморский край	абс.	4	3	8	2	2	1	1	0
		отн.*	0,20	0,14	0,37	0,09	0,10	0,05	0,05	0,00
	Россия	отн.*	1,00	0,99	0,82	0,51	1,72	0,51	0,45	0,50
ГЛПС	Приморский край	абс.	69	97	74	65	56	122	46	54
		отн.*	3,10	4,46	3,43	3,05	2,67	5,93	2,27	2,67
	Россия	отн.*	5,07	5,77	3,20	4,42	7,14	5,07	5,00	3,58
Туляремия	Приморский край	абс.	0	0	1	0	0	0	0	0
		отн.*	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Россия	отн.*	0,03	0,04	0,04	0,03	0,09	0,61	0,05	0,08

* На 100 тыс. населения.

а также установлено, что носителями патогенов являются мелкие млекопитающие [1–4]. В статье представлены данные о сочетанности очагов туляремии, лептоспироза и хантавирусной инфекции и значении мышевидных грызунов в их поддержании.

К настоящему времени на территории Приморья установлено существование очагов лесного типа, где циркулируют возбудители клещевого энцефалита, ГЛПС, туляремии, листериоза, стрептококковой инфекции, иерсиниозов, клещевого боррелиоза и полевого типа с циркуляцией возбудителей клещевого энцефалита, клещевого риккетсиоза, ГЛПС, туляремии, эризипелоида мышинного биовара, геморрагических септицемий, листериоза, лептоспироза. Наиболее значимыми в краевой патологии среди природно-очаговых инфекций, в качестве резервуаров возбудителей которых выступают мышевидные грызуны, являются ГЛПС, лептоспироз и туляремия (табл. 1).

ГЛПС в крае регистрируется ежегодно. Средне-многолетняя заболеваемость за последние годы составила 4,1 на 100 тыс. населения. Заболеваемость лептоспирозами носит спорадический характер. В течение 7 лет зарегистрирован 21 случай. Заражение происходило в природных очагах, где в качестве резервуара инфекции выступали мышевидные грызуны [2, 6, 7]. Общекраевой показатель заболеваемости колебался от 0,05 до 0,37 на 100 тыс. населения.

В Приморье имеются вялотекущие природные очаги туляремии, которые время от времени способны выходить за пределы своих границ – лесного экологического комплекса, что приводит к развитию эпизоотии среди грызунов лугополевого сообщества, далее инфекция по ручьям и рекам спускается к крупным водоемам (оз. Ханка), где обитает промысловое и чувствительное к инфекции животное – ондатра. Подтверждением сказанному является возникновение вспышки туляремии в Спасском районе в 1994 г. после контакта жителей района с инфицированными ондатрами. Интенсивный показатель заболеваемости составил 0,7 на 100 тыс. населения [1].

На момент установления факта существования сочетанных очагов природно-очаговых инфекций отсутствовали доступные методы лабораторной диагностики ГЛПС, что не позволяло нам документально под-

твердить или опровергнуть наличие этой инфекции в сочетанных очагах. Эпидемиологическое неблагополучие на территории края по ГЛПС отмечалось только на основании клинических проявлений заболевания у людей. С конца прошлого века при проведении рекогносцировочных эпизоотологических работ по лептоспирозу было установлено наличие сочетанных очагов ГЛПС и лептоспирозов [2, 3].

При анализе многолетних данных о существовании природных очагов туляремии, подтвержденных выделением культур туляремиального микроба, установлено, что практически все выявленные очаги расположены в лесной части края – в поймах рек, на стыке ландшафтов. Последние представлены многопородным широколиственным лесом с преобладанием дуба в Красноармейском, Партизанском и Хасанском районах, кедрово-широколиственным лесом – в Пожарском районе, кедрово-елово-широколиственным лесом – в Уссурийском районе. По типу очаги туляремии подразделяются на лесные (Красноармейский, Пожарский, Спасский, Уссурийский, Хасанский районы), лугополевые (Красноармейский, Спасский, Уссурийский районы), предгорно-ручьевые (Партизанский район, бух. Лашкевича), пойменно-болотные (Спасский район).

Фоновыми видами грызунов на лугах и полях является полевая мышь и дальневосточная полевка, в лесах – восточно-азиатская мышь и красно-серая полевка, в заболоченных низинах (рисовых чеках) – полевая мышь, дальневосточная полевка, серая крыса и ондатра. Фауна иксодовых клещей представлена четырьмя видами: *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica*, *Dermacentor silvarum*.

Туляремиальный микроб выделен от мышевидных грызунов пяти видов: дальневосточной полевки, полевой мыши, красно-серой полевки, восточно-азиатской мыши, бурундука. Установлено также участие в циркуляции возбудителя мыши-малютки, красной полевки, даурского хомячка, серой крысы и нескольких видов птиц: ошейниковой овсянки, дубровника, горихвостки, сойки, синицы, поползня. В 74,4% случаев агглютинины определялись в относительно невысоких титрах (1:20–1:80), но у отдельных особей, в том числе и у грызунов первой группы, они достигали

Таблица 2

Грызуны — носители хантавирусов, лептоспир и туляремиального микроба в очагах разных типов

Тип очага	Вид грызуна	Циркуляция		
		туляремиального микроба	лептоспир	хантавирусов
Лесной	Восточно-азиатская мышь	+	—	Амур
	Красно-серая полевка	+	—	Пуумала
	Сибирская красная полевка	—	—	Пуумала
Лугополевой	Полевая мышь	+	<i>Grippytyphosa, Javanica</i>	Хантаан
	Дальневосточная полевка	+	<i>Hebdomadis</i>	Хабаровск
Пойменно-болотный	Полевая мышь	+	<i>Grippytyphosa, Javanica</i>	Хантаан
	Дальневосточная полевка	+	<i>Hebdomadis</i>	Хабаровск
	Ондатра	+	—	—
	Серая крыса	—	—	Сеул

значений от 1:160 до 1:640. Положительные серологические находки из года в год регистрировали на одних и тех же микроучастках с незначительным перемещением по площади, что свидетельствует о наличии микроочагов стойкого сохранения возбудителя.

Доказано существование природных очагов лептоспироза в равнинных и низменных частях края, которые совпадают с границами лугополевых и пойменно-болотных типов очагов туляремии. Носительство патогенных лептоспир подтверждено выделением культур от трех видов грызунов: от полевой мыши изолированы лептоспиры *Grippytyphosa* и *Javanica*, от дальневосточной полевки и землеройки-бурозубки — лептоспиры серогруппы *Hebdomadis*. Приуроченность лептоспирозов к заболоченным низменностям объясняется тем, что их возбудители по своей природе являются гидробионтами. Не исключено, что грызуны первоначально инфицируются лептоспирами при контакте с зараженной водой, и лишь затем эпизоотия распространяется среди этой популяции животных с включением других механизмов заражения.

В Приморье инфицированность хантавирусами установлена у 17 видов мелких млекопитающих, в том числе у 13 видов грызунов, а также отряда насекомых, землеройковых и зайцеобразных и у 10 видов птиц. В том числе установлена инфицированность у птиц семейства овсянниковых, которые имеют значение и в циркуляции туляремиального микроба [7].

В крае зарегистрирована циркуляция пяти генотипов хантавирусов. Для каждого определен хозяин: полевая мышь — носитель геноварианта Far East вируса Хантаан, восточно-азиатская мышь — генотипа Амур, серая крыса — геноварианта VDV хантавируса Сеул, красно-серая полевка — генотипа Пуумала, дальневосточная полевка — генотипа Хабаровск [5, 7]. В этиологии ГЛПС подтверждена роль трех генотипов хантавирусов: Хантаан, Сеул, Амур.

В пойменно-болотных типах очагов туляремии, где фоновыми видами грызунов являются полевая мышь и дальневосточная полевка, зарегистрирована одновременная циркуляция в популяциях грызунов хантавирусов. Если взять за основу типирование очагов туляремии по ландшафтно-географическим характеристикам и наложить на них данные по инфициро-

ванности грызунов лептоспирами и хантавирусами, то сочетание всех трех перечисленных инфекций приходится на лугополевой и пойменно-болотный типы очагов, где одновременно присутствуют возбудитель туляремии, лептоспиры (серогруппы *Grippytyphosa, Javanica, Hebdomadis*), хантавирусы (генотипы Хантаан, Хабаровск, Сеул). Не выявлена циркуляция лептоспир в популяциях грызунов очагов лесного типа (табл. 2).

Территорией с очагами пойменно-болотного типа в Приморском крае является Спасский район, прилегающий к озеру Ханка, с заброшенной ирригационной системой, заросшими рисовыми чеками, в которых обитает ондатра, по инфекционной чувствительности и восприимчивости к туляремиальному микробу отнесенная к первой группе. Ондатра способна накапливать туляремиальные микробы и являться источником массивной инфекции. Именно контакт с зараженной ондатрой вызвал случаи заболеваний людей туляремией в 1994–2002 гг. По степени инфицированности грызунов хантавирусами и уровню заболеваемости людей Спасский район также относится к активной по ГЛПС территории.

Природные очаги лептоспирозов в настоящее время не играют ведущей роли в заболеваемости людей. Подавляющее большинство случаев заболеваний приходится на городские очаги, где источником инфекции являются собаки — носители *L. canicola*. Единичные серологические находки свидетельствуют о циркуляции на территории городского очага среди серых крыс лептоспир серогрупп *Canicola, Icterohaemorrhagiae*. Серые крысы также являются носителями хантавируса генотипа Сеул, который и обуславливает заболеваемость ГЛПС во Владивостоке [5]. Полученные данные свидетельствуют о наличии устойчивого городского очага сочетанной инфекции: ГЛПС и лептоспироза.

Культуры туляремиального микроба были изолированы также и от двух видов иксодовых клещей — *H. concinna*, *I. persulcatus*, что подтверждает для туляремии существование трехкомпонентной паразитарной системы. Роль эктопаразитов в циркуляции хантавирусов не установлена, однако имеются данные зарубежных авторов о роли гамазовых и краснотелковых клещей в трансмиссивной передаче инфекции. Таким образом, для сочетанных очагов туляремии,

лептоспироза и хантавирусов общим моментом является их полигостальность, поливекторность же установлена только для туляремии. В год эпиднеблагополучия по туляремии в Спасском районе (1994) при исследовании материала от 161 грызуна в 3,1% наблюдений по наличию в органах антигена хантавируса и антител к туляремийному микробу в титре 1:20–1:160 обнаружено микст-инфицирование.

Таким образом, на территории Приморского края существуют сочетанные природные очаги туляремии, лептоспирозной и хантавирусной инфекций. По ландшафтно-географическим характеристикам они принадлежат к пойменно-болотному и лугополевому типам. Циркуляцию возбудителей вышеуказанных инфекций обеспечивают в основном мышевидные грызуны двух видов – полевая мышь и дальневосточная полевка. Наличие всех трех нозологических форм чаще встречается в пойменно-болотном типе очагов и реже – в лугополевом.

Литература

1. Алленов А.В., Борзов В.П., Горбатов Н.А., и др. // *Материалы юбилейной научно-практ. конф., посвященной 85-летию санитарно-эпидемиологической службы России*. – Владивосток, 2007. – С. 144–150.
2. Борзов В.П., Горбатов Н.А., Ярошенко В.А. // *Акт. пробл. профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней : сб. работ*. – Иркутск, 1994. – С. 71–74.
3. Боровская Н.А., Борзов В.П., Ярошенко В.А. // *Акт. аспекты инфекционной патологии в Приморском крае : сб. работ*. – Владивосток, 2002. – С. 37–40.
4. Горбатов Н.А., Солдатов Г.М., Сотникова А.Н. //

НИР тема 1-3-74. заключит. отчет. – Иркутск ; Уссурийск, 1981. – С. 40–45.

5. Компанец Г.Г. *Распространение вируса Сеул на юге Дальнего Востока России и его роль в инфекционной патологии : автореф. дис. ... канд. мед. наук*. – Владивосток, 2002.
6. Макеев С.М., Марамович А.С., Носков А.К. и др. // *Проблемы особо опасных инфекций : сб. работ*. – Саратов, 2007. – № 94. – С. 24–27.
7. Слонова Р.А., Астахова Т.И., Компанец Г.Г. // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* – 1997. – № 5. – С. 97–101.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

COINCIDENCE OF THE NATURAL RESERVOIRS OF THE TULAREMIA, LEPTOSPIROSIS AND THE HANTAVIRAL INFECTION IN THE ECOLOGIC SYSTEMS OF THE PRIMORSKI KRAI

A.V. Allenov¹, V.P. Borzov¹, V.N. Krasnoshchekov¹, N.A. Borovskaja², T.V. Kushnareva³, V. Yu. Kiryakov⁴

¹ Primorsky antiplague station Rospotrebnadzor (Vladivostok),

² Vladivostok state medical university, ³ Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok),

⁴ Rospotrebnadzor Administration in the Primorsky Krai (Vladivostok)

Summary – In article the data about coincidence of the natural reservoirs of tularemia, leptospirosis and Hantavirus infection and the characteristic of their features are submitted. On landscape to geographical characteristics they belong to marsh and field types. Circulation of activators of the above-stated infections is provided basically on rodents of two kinds - the field mouse and Far East mouse. Presence of all of three forms can be found in marsh type of the reservoir more often and less often – in field.

Key words: tularemia, leptospirosis, hantavirus infection, reservoirs.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 40–43.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-002.151-092]-07-036.22(571.63)

С.А. Сокотун, И.В. Захарина, В.И. Афанасьева, В.А. Иванис, О.А. Сокотун

Владивостокский государственный медицинский университет

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

Ключевые слова: хантавирусная инфекция, синдромы, симптомы, тяжесть течения.

Проведен анализ историй болезни 130 больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС), находившихся в инфекционных стационарах Приморского края. При анализе степени тяжести инфекции в 2005–2007 гг. не выявлено легких форм заболевания, что, вероятно, связано с малой настороженностью врачей первичного звена. Клиническое течение заболевания имеет классические проявления при ГЛПС, вызванной серотипами *Hantaan* и *Amur*. Для ГЛПС, ассоциированной с вирусом *Seoul*, менее свойственна цикличность и более характерен полиморфизм клинических проявлений, включая симптомы поражения легких и печени.

В последние десятилетия благодаря внедрению современных методов эпидемиологической, клинической и лабораторной диагностики в изучении хантавирусной инфекции достигнуты значительные успехи, по-

лучены новые данные о распространении заболевания в мире, серотипическом и генотипическом разнообразии возбудителя, иммуноопосредованности патогенеза болезни и ее клинических особенностей в различных регионах [9, 10]. В Приморском крае одна из клинических форм хантавирусной инфекции – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), наряду с клещевым энцефалитом, занимает ведущее место среди природно-очаговых инфекций. Многолетнюю неблагополучную эпидемическую ситуацию в крае обуславливает ежегодная регистрация случаев болезни, высокая летальность, а также наличие, помимо природных, городского эпидемиологического очага инфекции, доминирующего в последние годы [3–5].

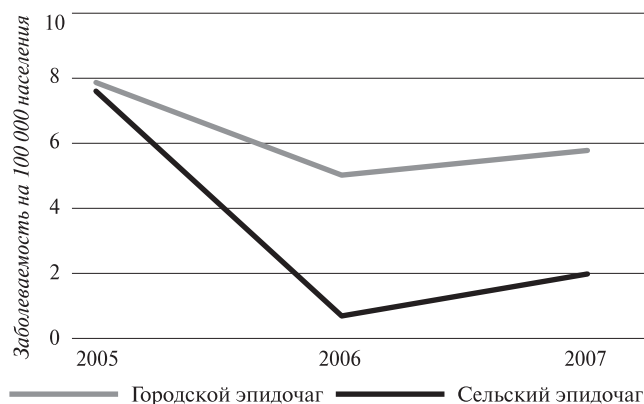


Рис. Динамика заболеваемости ГЛПС в Приморском крае за 2005–2007 гг.

Исследованиями последних лет установлено, что в очагах ГЛПС могут циркулировать несколько патогенных серотипов/генотипов вируса, которые обуславливают определенные клинические и эпидемиологические особенности инфекции [1, 2, 6, 8, 11]. Таким очагом является Приморский край, где к настоящему времени установлена циркуляция трех серотипов/генотипов хантавируса, патогенных для человека — *Hantaan* (геновариант *Far East*), *Amur* и *Seoul* (геновариант *Vladivostok* — *VDV*), носителями которых являются соответственно полевая, восточно-азиатская мыши и серая крыса [4, 7, 12].

За годы наблюдения (2005–2007) в крае зарегистрировано 256 случаев ГЛПС, из которых 150 (58,6%) — в сельских очагах и 106 случаев (41,4%) — в городском. Средний показатель заболеваемости ГЛПС в этот период составил 4,2 на 100 тыс. населения при значительном преобладании удельного веса городского эпидемиологического очага над сельским (соответственно 5,9 и 3,8). Динамика заболеваемости за проанализированный период времени довольно интересна (рис.). В 2005 г. в крае зарегистрировано 149 случаев ГЛПС со значительным преобладанием эпидемиологической роли сельских очагов — 106 случаев (71,2%). Показатель заболеваемости в этом году в крае был максимальным и составил 7,2 на 100 тыс. населения. При этом отмечались незначительные различия между двумя эпидемиологическими очагами: во Владивостоке показатель заболеваемости был 7,7, а в сельских районах — 7,4 на 100 тыс. населения. В 2006 г. в Приморье отмечено значительное снижение заболеваемости ГЛПС. В течение года было зарегистрировано 42 случая, причем 30 из них (71,4%) приходились на городской очаг и лишь 12 случаев (28,6%) — на сельские. Общекраевой показатель заболеваемости составил 2,1 на 100 тыс. населения. Низкая заболеваемость отмечалась в очаге сельского эпидемиологического типа (0,8 на 100 тыс. населения) в отличие от городского (4,7 на 100 тыс. населения). В 2007 г. в крае наметился подъем заболеваемости. Было зарегистрировано 65 случаев ГЛПС с равной долей городского и сельского эпидемиологических очагов: 33 и 32 случая соответственно. Показатель заболеваемости составил

3,2 на 100 тыс. населения, при этом в городском очаге (5,4 на 100 тыс. населения) он превышал показатели сельского в 2,5 раза (2,2 на 100 тыс. населения).

Указанная динамика заболеваемости прямо коррелирует с напряженностью эпизоотического процесса в популяции грызунов — носителей соответствующего серотипа/генотипа хантавируса. Подъемы заболеваемости совпадают с высокой среднегодовой численностью и инфицированностью соответствующей популяции грызунов [4].

В отдельных регионах края с доминированием восточно-азиатской мыши по результатам исследования сывороток крови больных в реакции торможения геммагглютинации с антигеном вируса *Amur* с 2004 г. этот этиологический агент был подтвержден в 27 случаях. Заболевания, обусловленные данным генотипом возбудителя, наблюдались исключительно в северных лесных районах Приморского края — Тернейском, Дальнегорском, Кавалеровском и Ольгинском.

Нами проанализирована динамика заболеваемости и клиническая картина ГЛПС в Приморском крае за последние три года (2005–2007) у 130 больных. Анализировались случаи заболевания в сельских очагах, где ГЛПС ассоциирована с геновариантом *Far East* вируса *Hantaan* и вирусом *Amur*, а также в городском очаге, где заболевания в основном обусловлены геновариантом *VDV* вируса *Seoul* [12]. Серологическое подтверждение диагноза ГЛПС получено у всех больных и проводилось в лаборатории ГЛПС НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток).

Возрастная структура больных характеризовалась преобладанием лиц зрелого возраста — от 40 до 50 лет — в городских очагах (28,9%). В то же время в сельских очагах было больше молодых лиц (заболевшие от 21 до 30 лет составили 39,5%, а при генотипе *Amur* — до 44,4%). Группу повышенного риска заражения в очагах сельского типа, где доминирует полевая и восточно-азиатская мыши, составляли лица в возрасте 31–40 лет (29,2%). В очагах циркуляции разных серотипов хантавируса среди больных ГЛПС преобладали мужчины (70% — в городском, 90% — в сельскохозяйственных очагах и 100% — в лесной зоне, где преобладает вирус *Amur*).

Важной особенностью последних лет явилась тенденция к утяжелению инфекции у большинства больных. При общем снижении заболеваемости в крае летальность увеличилась от 0,67% (2005) до 9,2% (2007). Следует также отметить, что в 2007 г. летальность во Владивостоке составила 3%, а в крае — 15,6%. Заражение этой группы краевых больных происходило значительной частью в лугополевых биоптатах, где доминирует полевая мышь — носитель геноварианта *Far East* вируса *Hantaan*. Анализ клинического течения ГЛПС у больных, находившихся в клинике инфекционных болезней ВГМУ (инфекционное отделение Приморской краевой клинической больницы № 2 г. Владивостока) и инфекционных стациона-

рах края, показал, что степень тяжести заболевания, обусловленного разными генотипами хантавирусов, существенно различалась. Критерии оценки тяжести ГЛПС были традиционными: наличие симптоматики шока и типичных осложнений, выраженность геморрагического синдрома, раннее развитие острой почечной недостаточности. Оказалось, что в последние годы изменились соотношения клинических форм по тяжести течения (табл. 1). Так, до 2005 г. легкая степень тяжести ГЛПС регистрировалась в 10,5% случаев в сельских очагах и до 45,1% случаев — в городских [2, 4]. Среди анализируемых наблюдений за 3-летний период легкие формы ГЛПС как в городских, так и в сельских очагах не выявлены. Не исключено, что это связано с трудностью диагностики такого течения болезни, атипизмом ведущих симптомов, а также недостаточной информированностью практических врачей о симптоматике легкого течения инфекции. Об этом свидетельствуют данные анализа диагнозов, которые были выставлены при первом обращении пациентов в медицинские учреждения: лихорадка неясной этиологии, пиелонефрит, иерсиниоз, острая респираторная вирусная инфекция и др. Среди госпитализированных в стационар чаще встречались больные с острой респираторной вирусной инфекцией (15,5%), энтеровирусная инфекция диагностирована в 0,9%, пневмония — в 0,7% и острый сепсис — в 0,4% наблюдений. Первичный диагноз ГЛПС был установлен в большинстве случаев — 82,5%.

Необходимо отметить, что если ранее ГЛПС, вызванная геновариантом вируса *Seoul*, у большинства пациентов протекала легко [2, 7], то в течение 2005–2007 гг. у половины госпитализированных (54,2%) наблюдалось среднетяжелое течение. В то же время при заболевании, вызванном вирусами *Hantaan* и *Amur*, средняя степень тяжести отмечалась у 21,4% больных. При ГЛПС, ассоциированной с вирусами *Hantaan* и *Amur*, в значительной части наблюдений отмечалось тяжелое течение инфекции (45,8 и 78,6%, соответственно) в отличие от заболевания, вызванного вирусом *Seoul* (32,4%).

При анализе клинических особенностей ГЛПС, ассоциированной с определенным генотипом вируса, выявлены некоторые различия по основным клинико-патогенетическим синдромам, а также широкий диапазон клинических вариантов течения заболевания (табл. 2). Общетоксический синдром наблюдался у всех больных и характеризовался, как правило, лихорадкой (высота и продолжительность которой прямо коррелировала с тяжестью течения инфекции) и выраженными симптомами интоксикации (головной боли, слабости, недомогания, болей в мышцах и суставах).

Геморрагический синдром при инфекции, обусловленной генотипами *Hantaan* и *Amur*, определялся у большинства больных, причем был ярко выражен и протекал с носовыми кровотечениями и ранней обильной сливной геморрагической сыпью. Осо-

Таблица 1
Структура больных ГЛПС, вызванной разными генотипами хантавируса, по степени тяжести клинических проявлений

Серотип вируса	Кол-во наблюдений	Форма тяжести					
		легкая		среднетяжелая		тяжелая	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Hantaan	48	0	0	26	54,2±1,9	22	45,8±2,3
Amur	14	0	0	3	21,4±13,7	11	78,6±1,2
Seoul	68	0	0	46	67,6±1,0	22	32,4±3,2

бенной частотой и тяжестью проявлений отличалась *Amur*-инфекция, где распространенный синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) наблюдался в 78,6±3,7% случаев. При *Seoul*-инфекции проявления ДВС-синдрома отмечены только у лиц с тяжелой формой заболевания (32,4±2,1%), при этом петехиальные элементы были необильными и локализовались в подмышечных областях. В лабораторных показателях, характеризующих геморрагический синдром, макрогематурия также чаще наблюдалась при *Hantaan*- и *Amur*-инфекциях, а при *Seoul*-инфекции лишь у 15 больных (22,1%). В то же время тромбоцитопения при ГЛПС, обусловленной вирусом *Seoul*, встречалась чаще по сравнению с инфекцией, вызванной другими генотипами, и диагностировалась у всех больных с тяжелым течением заболевания. У двух пациентов с ГЛПС, вызванной вирусом *Seoul*, жителей Владивостока, уровень тромбоцитов на 5–7-й дни болезни снижался до 20–60×10⁹/л. Напротив, тяжелые формы ГЛПС, вызванные генотипами *Hantaan* и *Amur*, характеризовались незначительным снижением тромбоцитов в ранний период болезни (140–170×10⁹/л).

Острая почечная недостаточность в различной степени присутствовала у всех пациентов с тяжелыми формами ГЛПС в Приморском крае. Она характеризовалась олигурией разной степени выраженности, повторной рвотой, болями в животе и поясничной области, азотемией. Признаки азотемии достигали больших величин при *Hantaan*-инфекции (содержание мочевины до 58,4 мкмоль/л, креатинина — до 1060 мкмоль/л). В то же время при *Seoul*-инфекции признаки острой почечной недостаточности хотя и наблюдались у половины больных (55,5±1,3%), но были менее выражены (уровень мочевины — в пределах 12,4–22,4 мкмоль/л, креатинина — 225–743 мкмоль/л). В урограмме у всех больных регистрировались типичные изменения — протеинурия, лейкоцитурия и цилиндрурия. Высокое содержание белка в ранний период ГЛПС было обнаружено только в 3 наблюдениях *Hantaan*-инфекции (6,3%). Заслуживает внимания вариант течения *Seoul*-инфекции без клинико-лабораторных признаков почечной недостаточности и геморрагического синдрома на протяжении всей болезни. У 6 человек со средне-тяжелой формой *Seoul*-инфекции течение болезни

Таблица 2

Основные клинические синдромы у больных ГЛПС в очагах циркуляции разных генотипов хантавируса

Синдром	Частота при различных возбудителях					
	Seoul		Hantaan		Amur	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Общетоксический	68	100,0	48	100,0	14	100,0
Острая почечная недостаточность	38	55,8±1,3	48	100,0	5	35,7±9,6
Геморрагический	22	32,4±2,1	27	56,3±1,8	11	78,6±3,7
Гепатит	60	88,2±0,5	18	37,5±2,7	4	28,6±11,3

характеризовалось 6–7-дневной лихорадкой, общетоксическими проявлениями, респираторным синдромом и, как правило, признаками цитолиза.

Наступление периода полиурии обычно означает приближение выздоровления. Однако следует отметить, что у большинства больных *Seoul*-инфекцией этот период вообще отсутствовал и лишь в одном случае тяжелой инфекции диурез достиг 5200 мл.

Также одним из наиболее часто встречающихся синдромом у больных ГЛПС в очагах различных генотипов был гепатит. Чаше его проявления (гепатоспленомегалия, цитолиз: аланинаминотрансфераза – от 2 до 10 норм) были выражены у больных *Seoul*-инфекцией (88,2±0,5%). При заболевании, ассоциированном с серотипами *Hantaan* и *Amur*, проявления гепатита встречались реже (соответственно 37,5±2,7 и 28,6±11,3%), гепатоспленомегалия была отмечена в 44,3% случаев, а синдром цитолиза был минимальный (уровень аланинаминотрансферазы – 2–3 нормы).

К особенности клиники *Seoul*-инфекции следует отнести наличие респираторного синдрома (9 случаев), который проявлялся сухим кашлем, ослаблением дыхания, сухими хрипами. На рентгенографии у 6 больных (8,8%) отмечалось усиление легочного рисунка, у 3 (4,4%) – признаки бронхопневмонии.

Таким образом, на территории Приморского края в этиологии ГЛПС имеют значение три генотипа хантавируса. При анализе степени тяжести инфекции в Приморском крае в 2005–2007 гг. не выявлено легких форм заболевания, что, вероятно, связано с малой настороженностью врачей первичного звена. Клиническое течение заболевания имеет классическое проявление при ГЛПС, вызванной серотипами *Hantaan* и *Amur*. Для ГЛПС, ассоциированной с вирусом *Seoul*, менее свойственна цикличность и более характерен полиморфизм клинических проявлений, включая симптомы поражения легких и печени.

Литература

1. Апекина Н.С., Мясников Ю.А., Бобылкова Т.В. и др. // Актуальные аспекты природно-очаговых болезней: мат. межрегион. научно-практ. конф., посвященной 80-летию Омского НИИ ПИ. – Омск, 2001. – С. 84–85.
2. Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника, иммунокорректирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом в регионе циркуляции разных

серотипов хантавирусов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Владивосток, 2004.

3. Компанец Г.Г., Слонова Р.А., Иванис В.А. // Генодиагностика в практической медицине Дальнего Востока: сб. работ 2-й регион. науч.-практ. конф. – Владивосток, 2002. – С. 24–25.
4. Слонова Р.А., Астахова Т.И., Компанец Г.Г. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1997. – № 5, прил. – С. 97–101.
5. Слонова Р.А., Компанец Г.Г., Подогова Л.М. и др. // Вopr. вирусол. – 1999. – № 5. – С. 213–217.
6. Gligic A., Taller A., Obradovic M. et al. // 3rd Int. Conf. on HFRS and Hantaan: abstracts. – Helsinki (Finland), 1995. – P. 12.
7. Lee H.W. Hantavirus hunting. – Seoul: Sigongsa, 2004.
8. Kariwa H., Yoshizumi S., Arikawa J. et al. // 3rd Int. Conf. on HFRS and Hantaan: abstracts. – Helsinki (Finland), 1995. – P. 34.
9. Schmaljohn C., Hjelle B. // Emerg. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 3, No. 2. – P. 95–104.
10. Tkachenko E., Dekonenko A., Ivanov A. et al. // Emergence and Control of Rodent-borne Viral Diseases. – France: Elsevier, 1999. – P. 63–72.
11. Xu Z., Ruan Y., Liu W. // Emergence and Control of Rodent-borne Viral Diseases. – France: Elsevier, 1999. – P. 73–80.
12. Yashina L., Patrushev N., Ivanov L. et al. // Virus Res. – 2000. – Vol. 70. – P. 31–44.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

CLINIC AND EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF THE HANTAVIRAL INFECTION IN PRIMORSKI KRAI

S.A. Sokotun, I.V. Zaharina, V.I. Afanas'eva, V.A. Ivanis, O.A. Sokotun

Vladivostok state medical university

Summary – The analysis of case records of 130 patients by hemorrhagic fever with nephritic syndrome, taking place in infectious hospitals of Primorsky Krai is done. At the analysis of a degree of incidence of an infection in 2005–2007 there were no easy forms of disease that, probably, is connected to small vigilance of doctors of a primary link. Clinical current of disease has classical signs at the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, caused by serotypes *Hantaan* and *Amur*. For hemorrhagic fever with nephritic syndrome, associated with virus *Seoul*, cyclicity is less peculiar and polymorphism of clinical signs, including symptoms of lung and liver insufficiency is more often.

Key words: hantavirus infection, syndromes, symptoms, severity.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 43–46.

УДК 579.833.29:599.323.4(571.63):574.3

Л.Н. Яшина¹, Л.И. Иванов², Р.А. Слонова³, Г.Г. Компанец³, В.В. Гуторов¹, Т.В. Кушнарева³, Н.П. Высочина², С.А. Абрамов⁴, Т.А. Дунал⁴, Н.М. Пуховская², Н.И. Здановская²

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (пос. Кольцово Новосибирской обл.), ² Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора, ³ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток), ⁴ Институт систематики и экологии животных СО РАН (г. Новосибирск)

ХАНТАВИРУСЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ В ПОЛЕВКАХ *MICROTUS FORTIS* И *MICROTUS MAXIMOWICZII*

Ключевые слова: хантавирус, полевки, генотип.

Методом обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием — были изучены 8 полевых штаммов хантавирусов, выделенных от полевок рода *Microtus* из дальневосточного региона России. Было проведено независимое зоологическое определение вида грызунов-носителей и анализ их митохондриальной ДНК. Сравнительный анализ установленных нуклеотидных последовательностей фрагментов М-сегмента вирусного генома штаммов хантавирусов и мтДНК полевок-носителей с нуклеотидными последовательностями, представленными в базе данных GenBank, выявил циркуляцию двух генотипов KBRV и VLAV в двух видах полевок — носителей вирусов. Наши исследования впервые выявили циркуляцию генотипов KBRV в полевках *M. maximowiczii* и VLAV в полевках *M. fortis* на территории Амурской области, а также подтвердили циркуляцию VLAV в полевках *M. fortis* на территории Приморского края.

На Дальнем Востоке России носителями хантавирусной инфекции являются не менее 11 видов грызунов [6]. Среди них у дальневосточной полевки *Microtus fortis* выявлен один из наиболее высоких уровней инфицированности. Доля грызунов, в легочной ткани которых при обследовании был найден хантавирусный антиген, достигала 19,7%, а специфические антитела в сыворотках крови обнаруживают у 23,6% животных [2, 6]. В 1988 г. от *M. fortis*, отловленной на территории Хабаровского края, был изолирован штамм Mf43/KBRV-88, идентифицированный как новый вирус Хабаровск (KBRV) [4]. На основании изучения полной структуры генома хантавируса KBRV, а также его антигенных свойств, установлена уникальность данного вируса [4, 8]. В 1991 г. от *M. fortis* был изолирован штамм Mf252/KBRV-91, который значительно отличался от вируса KBRV [2]. Различие кодируемых аминокислотных последовательностей фрагмента белка G2 составляло 12%. Позднее при анализе вирусной последовательности S-сегмента генома РНК, полученной от инфицированной хантавирусом *M. fortis*, отловленной на территории Приморского края, также были выявлены значительные отличия изолята от KBRV [5]. Различие нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с вирусом KBRV составило 21 и 10%, что соответствует критерию различий двух генотипов. Это сделало возможным предположить, что дальневосточная полевка является носителем другого генотипа, отличного от KBRV, названного Владивосток (VLAV). Нами при генетическом исследовании материала от серопозитивных дальневосточных полевок, отловленных на других участках очаговой территории Приморского

края, на основании анализа М-сегмента генома было установлено значительное (22%) отличие в нуклеотидных последовательностях от KBRV [6]. Недавно на территории Бурятии установлена циркуляция VLAV в популяциях *M. fortis* и *Microtus oeconomus* [7], а исследования, проведенные на территории Китая и внутренней Монголии, позволили установить, что хантавирус VLAV циркулирует в популяциях *M. fortis*, а KBRV у *M. maximowiczii* [9].

В настоящем исследовании проведена характеристика геномов хантавирусов и митохондриальной ДНК его природных хозяев — полевок рода *Microtus*, отловленных на территории Дальнего Востока России.

Исследованы антиген- или серопозитивные образцы ткани легких 17 полевок рода *Microtus*, отловленных в 1997–2005 гг. на территории Приморского, Хабаровского краев и Амурской области. Суммарная РНК/ДНК выделена из ткани легких с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) и подвергнута анализу методом обратной транскрипции — полимеразно-цепной реакции (ОТ–ПЦР) для выявления фрагментов М-сегмента генома. Для анализа выбран фрагмент гена гликопротеина G2, соответствующий нуклеотидным позициям 2735–2993 штамма KBRV Mf43. Амплификация проводилась методом ОТ–ПЦР в одной пробирке с использованием набора Titan (Roche GmbH, Germany). Образцы легких ОТ–ПЦР-позитивных грызунов использовали для анализа митохондриальной ДНК (мтДНК) на высоковариабельном участке, примыкающем к региону начала репликации тяжелой цепи мтДНК (участок Д-петли). ПЦР-продукты разделены методом электрофореза в 1,2% агарозном геле, фрагменты подходящего размера вырезаны из геля и очищены с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany). ПЦР-продукты секвенированы на автоматическом анализаторе Applied Biosystem 310. Полученные последовательности анализировали путем сравнения с известными последовательностями хантавирусов из банка данных GenBank. Для филогенетического анализа различий между выделенными изолятами и известными хантавирусами использован метод объединения соседних последовательностей. Индексы поддержки получены для 1000 повторов анализа. Установленные нами нуклеотидные последовательности хантавирусов зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами EU360905–EU360908.

Таблица

Результаты генетического и серологического тестирования образцов легких от полевок рода *Microtus*.

№ образца	Год отлова	Место отлова	Титр		Генотип	
			антигена	антител	вируса	грызуна
18650	1997	Городечное Приморского кр.	+	—	VLAV	<i>M. fortis</i>
26648	1997	Спасский р-н Приморского кр.	+	—	VLAV	<i>M. fortis</i>
605	2002	Черняево Амурской обл.	—	1:80	KBRV	<i>M. maximowiczii</i>
612	2002	Черняево Амурской обл.	1:4	1:20	KBRV	<i>M. maximowiczii</i>
657	2002	Сковородино Амурской обл.	1:16	1:80	KBRV	<i>M. maximowiczii</i>
679	2002	Сковородино Амурской обл.	+	—	KBRV	<i>M. maximowiczii</i>
28179	2005	Спасский р-н Приморского кр.	+	1:20	VLAV	<i>M. fortis</i>
1151	2005	Благовещенск Амурской обл.	—	1:20	VLAV	<i>M. fortis</i>

Для анализа генетической вариабельности хантавирусов, циркулирующих в полевках рода *Microtus*, нами были проанализированы 17 вирусосодержащих образцов (полевых штаммов). Нуклеотидные последовательности М-сегмента вирусного генома (позиции 2735–2993) были выявлены в 8 образцах (табл.).

В сравнительный анализ, помимо представителей всех известных, были включены опубликованные в 2008 г. последовательности штаммов вирусов KBRV и VLAV из Китая и Бурятии [7, 9]. Результаты анализа показали, что в четырех образцах нами были выявлены последовательности вируса KBRV, а в оставшихся четырех образцах — вируса VLAV. Все штаммы KBRV были близки прототипному штамму KBRV Mf43. Следующим по степени близости являлся штамм TOPV, изолированный от сибирского лемминга; различия составляли 17,8–22,8% для нуклеотидных и 8,6% — для аминокислотных последовательностей. Вариабельность геномов KBRV находились в пределах 2,3–11,4%, при этом аминокислотные последовательности всех штаммов на выбранном участке оказались полностью идентичны прототипному вирусу. Вариабельность геномов VLAV составляла 0,9–11,0%, аминокислотные последовательности были идентичны друг другу. Установленные последовательности оказались наиболее близки (4,1–11,9% нуклеотидных и 0% аминокислотных различий) последовательностям штаммов VLAV из города Fusong, расположенного в Китае в 400 км от Владивостока. В то же время различие с географически более удаленными штаммами VLAV из Бурятии достигало 16,9–19,6% для нуклеотидных и 3,8% — для аминокислотных последовательностей. Нами установлено значительное различие между хантавирусами VLAV и KBRV, циркулирующими на одной территории. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности отличались на 20,5–24,7 и 11,3% соответственно. Как и в случае с вирусом KBRV, различие нуклеотидных последовательностей VLAV по сравнению со штаммом TOPV было меньше и составляло 17,8–22,8%, различие аминокислотных последовательностей — 10,0%.

Для определения генетического родства изучаемых штаммов с ранее известными хантавирусами на основе М-сегмента вирусного генома реконструирована его филогения (рис.). На филогенетическом

древе все штаммы KBRV образуют единую группу с высоким индексом поддержки, что говорит о единстве их происхождения. Внутри группы штаммы KBRV объединяются по географическому признаку, а вся группа KBRV объединена на филогенетическом древе с TOPV. Более сложная картина филогенетических взаимосвязей выявлена для штаммов VLAV. Эта группа, имеющая высокий уровень поддержки, разделена на две подгруппы. В первую вошли объединенные по географическому принципу штаммы из Приморского края и Китая (Городечное и Fusong), из Приморского края и Амурской области (Спасск и Благовещенск). Штаммы из Бурятии образовали вторую подгруппу. Таким образом, анализ вирусных последовательностей М-сегмента генома четко показывает, что хантавирусы KBRV и VLAV представляют две различных ветви на филогенетическом древе и являются двумя различными генотипами.

Большинство имеющихся в настоящее время данных согласуются с гипотезой о параллельной эволюции хантавирусов и их природных хозяев. Предшествующие данные о циркуляции двух генотипов вируса у *M. fortis* противоречат этой гипотезе и ставят вопрос о более точной идентификации природных хозяев генотипов KBRV и VLAV. Ранее отмечалось, что прототипный штамм вируса KBRV был изолирован от дальневосточной полевки *M. fortis*, отловленной в Хабаровском крае. Из того же вида носителя в Приморском крае были выявлены вирусные последовательности VLAV [3, 5].

Для более точного определения вида полевок рода *Microtus* проведено независимое зоологическое определение вида носителей и анализ их мтДНК. Нами получены и секвенированы фрагменты мтДНК длиной 403 нуклеотида. Межвидовая дивергенция между различными видами грызунов в пределах исследованного участка Д-петли варьировала от 5,5 до 13,7%. При этом внутривидовая вариабельность данного участка ДНК не превышает 4,5%. При сравнительном анализе мтДНК животных, являющихся носителем вируса KBRV, и животных, у которых был выявлен генотип VLAV, оказалось, что различие составляет более 9%. При этом различие мтДНК носителей VLAV не превышало 1,0%, а различие мтДНК полевок — носителей

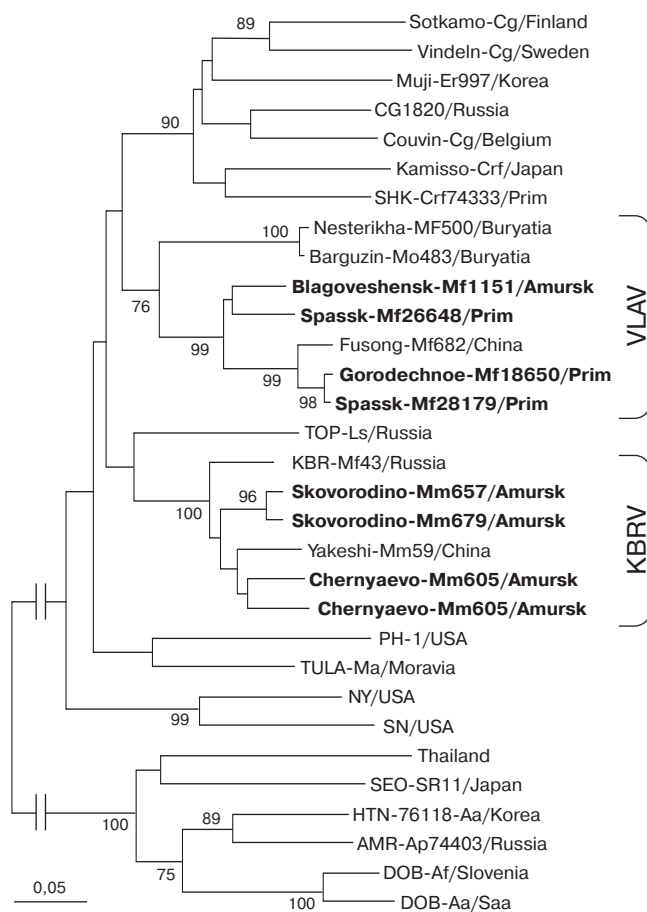


Рис. Филогенетическое древо, построенное на основе нуклеотидной последовательности фрагмента М-сегмента генома хантавирусов, позиции 2735–2993. Жирным шрифтом выделены исследованные нами полевые штаммы. Показаны индексы поддержки больше 70.

KBRV составляло 1,0–2,9%. Полученные данные свидетельствуют о том, что различающиеся генотипы хантавирусов KBRV и VLAV также циркулируют в двух различных носителях. Определение видовой принадлежности полевок на основании анализа признаков черепа и рисунка жевательной поверхности коренных зубов [1], а также мтДНК показало, что штаммы KBRV выявлены от полевок Максимовича (*M. maximowiczii*), а VLAV – от дальневосточных полевок (*M. fortis*).

Ранее, при отсутствии доступных для сравнения последовательностей М-сегмента генома VLAV, мы предположили наличие нового, генетически отличающегося вируса в *M. fortis*, отловленных в окрестности п. Городечное [3]. Настоящее исследование, а также появление последовательностей М-сегмента VLAV в GenBank, позволило уточнить ранее полученные данные. Сравнение установленных и выявленных ранее последовательностей хантавируса от *M. fortis*, отловленных в окрестности п. Городечное, выявило их высокое родство (0–0,9% различий) и принадлежность к последовательностям VLAV. Циркуляцию VLAV в *M. fortis* и циркуляцию KBRV в *M. maximowiczii* подтвердили данные зарубежных исследователей [7, 9]. Ранее присутствие хантавирусной инфекции у *M. ma-*

ximowiczii было описано российскими учеными на территории Читинской области, однако вирус не был идентифицирован. Наша работа впервые выявила циркуляцию вируса KBRV в полевах *M. maximowiczii* и VLAV – в полевах *M. fortis* на территории Амурской области, а также подтвердила циркуляцию VLAV в полевах *M. fortis* на территории Приморского края.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ВТЕР в рамках проекта МНТЦ 0805.2.

Литература

1. Громов И.М., Ембаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. – СПб.: Изд-во Зоол. ин-та РАН, 1995.
2. Иванов Л.И., Чижиков В.Е., Деконенко А.Е. и др. // Хантавирусы и хантавирусные инфекции / под ред. Р.А. Слоновой, В.А. Иванис. – Владивосток: Примпо-лиграфкомбинат, 2003. – С. 151–161.
3. Яшина Л.Н. // Журн. микробиол., эпидемиол. и имму-нобиол. – 2006. – № 3. – С. 78–81
4. Horling J., Chizhikov V., Lundkvist A. et al. // J. Gen. Virol. – 1996. – Vol. 77. – P. 687–694.
5. Kariwa H., Yoshimatsu K., Sawabe J. et al. // Virus Res. – 1999. – Vol. 59. – P. 219–228.
6. Kosoy M., Slonova R., Mills J. et al. // J. Vect. Ecol. – 1997. – Vol. 22. – P. 52–63.
7. Plyushina A., Laakkonen J., Niemimaa J. et al. // Virol. J. – 2008. – Vol. 5. – P. 4.
8. Vapalahti O., Lundkvist A., Fedorov V. et al. // J. Virol. – 1999. Vol. 73. – P. 5586–5592.
9. Zou Y., Wang J.B., Gaova H.S. et al. // J. Med. Virol. – 2008. – Vol. 80. – P. 680–688.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

HANTA VIRUSES, CIRCULATING IN MICE *MICROTUS FORTIS* AND *MICROTUS MAXIMOWICZII*

L.N. Yashina¹, L.I. Ivanov², R.A. Slonova³, G.G. Kompanets³, V.V. Gutorov¹, T.V. Kushnareva³, N.P. Vysochina², S.A. Abramov⁴, T.A. Dupal⁴, N.M. Puhovska², N.I. Zdanovska²

¹ State scientific centre of virology and biotechnologies «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk area), ² Khabarovsk antiplague station Rospotrebnadzor, ³ Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok), ⁴ Institute of systematization and ecology of animals Siberian branch of the Russian Academy of Science (Novosibirsk)

Summary – By the method of a return transcription - polymerase chain reaction with the subsequent 8 strains of Hantavirus, allocated from mice sorts *Microtus* from Far East region of Russia have been investigated. Independent zoological definition of a kind of rodents of carriers and the analysis of mitochondrial DNA have been done. The comparative analysis established nucleotide sequences of fragments of M of a segment virus of genome of the Hantavirus and m-DNA of mice with nucleotide sequences submitted in database GenBank, has revealed circulation of two genotypes KBRV and VLAV in two kinds of rodents – carriers of viruses. Our researches for the first time have revealed circulation of genotypes KBRV in mice *M. maximowiczii* and VLAV in mice *M. fortis* in territory of the Amur area, and also have confirmed circulation VLAV in mice *M. fortis* in territory of Primorsky Krai.

Key words: hantavirus infection, mice, genotype.

УДК 599.323:578.833.29:574.3](571.63)

Т.В. Кушнарева

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МЫШЕВИДНЫХ ГРЫЗУНОВ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ЕГО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, природные очаги, мышевидные грызуны, эпизоотологический потенциал.

В ходе эпизоотологических исследований, проведенных в 2001–2007 гг. в очагах хантавирусной инфекции на территории Приморского края, обследовано на присутствие антигена хантавируса и специфических антител 6462 особи мышевидных грызунов 10 видов. Установлено участие 7 видов в циркуляции хантавирусов. Предложен показатель эпизоотологического потенциала (Иэп) для оценки отдельных видов грызунов в качестве возможного источника хантавируса в годы разной активности эпизоотического процесса в популяциях грызунов-носителей этиологических агентов геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Показано, что ежегодная эпидемическая ситуация в крае определяется эпизоотологическим потенциалом грызунов рода *Apodemus* — экологических хозяев патогенных хантавирусов *Far East* и *Amur*. Результаты корреляционного анализа свидетельствуют об эффективности применения Иэп для зоологического и эпидемиологического мониторинга в природных очагах хантавирусной инфекции.

Актуальность проблемы геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) обусловлена широким распространением этого заболевания во многих странах мира, которое предопределяют такие свойства этой инфекции, как природно-очаговый характер, высокая восприимчивость человека, возможность контакта людей с инфицированными мелкими млекопитающими [7, 8]. В России по числу заболеваний ГЛПС занимает одно из ведущих мест среди зоонозов [6]. Активные очаги хантавирусной инфекции в европейской части России расположены в Предуралье и Среднем Поволжье [1, 2, 9], на Дальнем Востоке России — на территории Амурской области, Хабаровского и Приморского краев [3, 5]. Проявление эпидемического процесса в природных очагах хантавирусной инфекции на территории Приморского края, как установлено, зависит от циркуляции в регионе патогенных хантавирусов *Far East* (геновариант вируса *Hantaan*) и *Amur* и распространения их экологических хозяев — грызунов рода *Apodemus* (*Apodemus agrarius* и *Apodemus peninsulae* соответственно) [4].

Важным этапом в планировании и проведении противоэпидемических мероприятий при ГЛПС является разработка краткосрочных прогнозов заболеваемости. При этом ставится задача поиска факторов, связанных с проявлением заболеваемости или свидетельствующих о приближении опасной эпидемиологической ситуации. Антропогенная трансформация окружающей среды, развитие массового туризма и рекреационного отдыха, возросший объем сбора дикоросов приводят к увеличению контактов как местного, так и пришлого населения с природными очагами хантавирусной инфекции. Значительное число

заболеваний ГЛПС в отдельные годы, среди которых нередко случаи с тяжелым течением и летальным исходом, эпидемиологическая связь заболеваний с дикими мышевидными грызунами обуславливают необходимость ежегодной оценки роли последних в поддержании природных очагов хантавирусной инфекции разных типов.

Цель данной работы заключалась в оценке роли отдельных видов мышевидных грызунов-носителей патогенных хантавирусов в годы с разной активностью эпизоотии в их популяциях в качестве потенциальных источников возбудителей ГЛПС.

Эпизоотологические исследования на территории Приморского края были проведены в очагах лугополевого и лесного типов в 2001–2007 гг. Всего обследовано 6462 особи мышевидных грызунов 10 видов. Для оценки роли отдельных видов в эпизоотологии хантавирусной инфекции исходное значение имеет показатель их численности в местах постоянного или временного обитания.

Численность мелких млекопитающих учитывали стандартным методом ловушко-линий, который дает вполне сравнимые относительные данные по численности популяции и ее изменениям по сезонам и годам. Присутствие хантавирусного антигена в легких и специфических антител в сыворотках крови или настоях сердец у отловленных зверьков выявляли с помощью иммуноферментного анализа с коммерческой тест-системой «Хантагност» и непрямого метода флюоресцирующих антител с культуральным диагностикумом по общепринятым методикам. Роль каждого вида грызунов в качестве потенциального источника хантавируса в исследуемом очаге оценивали с помощью показателя (индекса) эпизоотологического потенциала (Иэп), который определялся произведением относительной инфицированности на относительную численность данного вида. За относительную инфицированность каждого вида принималось число особей с антигеном хантавируса в органах и/или специфическими антителами в крови в пересчете на 100 отловленных зверьков данного вида, за относительную численность — число отловленных особей данного вида в пересчете на 100 ловушко-суток. Для оценки ежегодной заболеваемости в очагах сельского эпидемиологического типа применялся показатель относительной заболеваемости — число случаев ГЛПС в сельских районах в пересчете на 100 тыс. сельского населения Приморского края.

Таблица 1

Показатель эпизоотологического потенциала мышевидных грызунов в природных очагах ГЛПС разных типов, 2001–2007 гг.

Год	Значения ИЭП в очагах									
	лугополевых					лесных				
	ПМ	ВАМ	ДВП	КСП	КП	ПМ	ВАМ	ДВП	КСП	КП
2001	226,7	14,6	107,4	0,0	0,0	0,0	63,6	0,0	43,8	14,7
2002	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	56,1	4,5	11,9	1,5
2003	48,8	0,0	30,2	2,3	4,7	0,0	37,2	2,1	15,0	2,1
2004	62,3	5,2	20,7	0,0	0,0	10,3	186,8	0,0	31,0	0,0
2005	66,2	2,1	16,6	2,1	0,0	13,6	561,7	2,3	165,5	0,0
2006	10,0	0,0	0,0	13,3	0,0	0,0	41,0	0,0	32,9	0,0
2007	172,6	5,0	14,9	2,5	2,5	0,0	46,9	0,0	0,0	0,0

Примечание: ПМ – полевая мышь; ВАМ – восточно-азиатская мышь; ДВП – дальневосточная полевка; КСП – красно-серая полевка; КП – красная полевка.

Анализ данных проводили с помощью коэффициента линейной регрессии и корреляции и коэффициента ранговой корреляции Спирмена, используя программный пакет Statistica.

В течение исследуемого периода присутствие хантавируса было выявлено у 7 видов мышевидных грызунов: 3 вида входят в семейство мышиные (Muridae) – полевая (*Apodemus agrarius* Pall.) и восточно-азиатская (*A. peninsulae* Thom.) мыши, серая крыса (*Rattus norvegicus* Berk.); 4 вида входят в семейство хомяковые (Cricetidae) – дальневосточная (*Microtus fortis* Buch.), красно-серая (*Myodes rufocanus* Sund.) и красная (*Myodes rutilus* Pall.) полевки, крысовидный хомячок (*Tscherskia albipes* Ogn).

Участие мышевидных грызунов в поддержании природных очагов хантавирусной инфекции разных типов было оценено при использовании ИЭп для каждого вида (табл. 1). При этом выявлены значительные различия между видами по уровню их эпизоотологического потенциала в типичных и несвойственных им местах обитания. В очагах лугополевого типа значения среднего многолетнего показателя эпизоотологического потенциала у *A. agrarius* и *M. fortis* (содоминант в лугополевых стациях) были соответственно в 27,4 и 20,8 раза выше, чем в лесных биотопах. В очагах лесного типа значения среднего многолетнего ИЭп у *A. peninsulae* и *M. rufocanus* (содоминант в лесных стациях) были в 37,3 и 14,8 раза соответственно выше, чем в лугополевых биотопах. Значение среднего многолетнего показателя эпизоотологического потенциала у *M. rutilus* было очень низким как в очагах лугополевого (ИЭп=1,0), так и лесного (ИЭп=2,6) типов. Полученные результаты показали, что во все годы наблюдений эпизоотологический потенциал *A. agrarius* и *A. peninsulae* – основных носителей патогенных генотипов хантавирусов – был выше, чем их содоминантов в очагах лугополевого и лесного типов.

В среднем за 7 лет доля в отловах полевых (2371) и восточно-азиатских (2194) мышей составила 36,3±0,9

и 33,6±1,0% соответственно. Дифференцированный подход к анализу материала с учетом разных ландшафтных зон выявил следующие различия между основными грызунами-носителями хантавирусов на территории края. В лугополевых очагах абсолютно доминировали полевые мыши, доля которых в отловах составляла от 55,6±2,0% (2003) до 87,3±2,3% (2006). У полевых мышей наблюдались колебания средних значений относительной инфицированности от 0,6±0,5 (2006) до 10,2±2,3 (2001), относительной численности – от 7,7 (2003) до 22,1 (2001), ИЭп – от 10,0 (2006) до 226,7 (2001). В очагах лесного типа преобладали восточно-азиатские мыши, доля которых в отловах составляла от 25,7±5,1% (2006) до 83,5±2,1% (2003). При этом у восточно-азиатских мышей среднегодовые значения показателей варьировали в широких пределах: относительной инфицированности от 6,9±1,6 (2003) до 27,4±2,9 (2005), относительной численности – от 1,9 (2006) до 20,5 (2005) и ИЭп – от 37,2 (2003) до 561,7 (2005).

Заболеваемость ГЛПС в сельских районах края за 2001–2007 гг. характеризовалась значительными колебаниями. При анализе сопряженности между заболеваемостью ГЛПС и эпизоотологическим потенциалом мышей рода *Apodemus* установлена тесная прямая связь между многолетней динамикой показателя относительной заболеваемости и показателя эпизоотологического потенциала (коэффициент линейной корреляции $r=0,9556$, $t=7,249$, $P=0$). Изучение степени зависимости заболеваемости от таких факторов, как численность, инфицированность и эпизоотологический потенциал отдельных видов рода *Apodemus*, проведенное с помощью метода ранговой корреляции Спирмена, выявило значительные различия по тесноте связи между используемыми показателями. Наиболее тесная прямая связь у обоих видов грызунов установлена между показателями эпизоотологического потенциала и относительной заболеваемости (коэффициент ранговой корреляции Спирмена для *A. agrarius* и *A. peninsulae* имел значение $r=0,786$

Таблица 2

Оценка эпидемиологической роли грызунов рода *Apodemus* по показателю их эпизоотологического потенциала (Иэп), 2001–2007 гг.

Год	Значения Иэп		Заболеваемость ГЛПС*
	<i>A. agrarius</i>	<i>A. peninsulae</i>	
2001	226,7	63,6	4,4
2002	66,7	56,1	2,2
2003	48,8	37,2	1,9
2004	62,3	186,8	2,0
2005	66,2	561,7	7,3
2006	10,0	41,0	0,8
2007	172,6	46,9	2,7

* На 100 тыс. населения.

и $r=0,714$ соответственно). При анализе тесноты связи между относительной инфицированностью грызунов и относительной заболеваемостью установлена более выраженная связь для *A. agrarius* ($r=0,642$, $P=0,110$), чем для *A. peninsulae* ($r=0,214$; $P=0,604$). В то же время при анализе тесноты связи между относительной численностью грызунов и относительной заболеваемостью установлена значительно более выраженная связь для *A. peninsulae* ($r=0,732$; $P=0,053$), чем для *A. agrarius* ($r=0,071$; $P=0,843$).

Таким образом, корреляционный анализ показал высокую степень достоверности применения такого потенциально емкого показателя, как Иэп, который одновременно включает в себя показатели относительной численности и инфицированности, для оценки эпидемиологической роли видов грызунов-носителей патогенных хантавирусов.

Ежегодное определение показателя эпизоотологического потенциала для *A. agrarius* и *A. peninsulae* в очагах хантавирусной инфекции лугополевого и лесного типов позволило оценить эпидемиологическую роль этих видов грызунов в отдельные годы (табл. 2). Самый высокий уровень заболеваемости в сельских районах края, отмеченный в 2005 г., коррелировал с эпизоотологическим потенциалом восточно-азиатской мыши, Иэп которой в этот год имел наивысшее значение за весь исследуемый период. Высокая заболеваемость ГЛПС в 2001 г. и осенне-зимний сезон 2007 г. была сопряжена с высокими значениями Иэп у *A. agrarius*, отмеченными в эти годы наблюдений. В 2006 г. при одновременно низких значениях Иэп полевой и восточно-азиатской мышей заболеваемость ГЛПС в очагах сельского эпидемиологического типа была самой низкой.

Проведенные исследования на очаговых территориях Приморского края показали, что в эпидемическом процессе при ГЛПС принимают активное участие оба вида мышей рода *Apodemus*. При этом ежегодная эпидемическая ситуация и характер эпидемического процесса в разных ландшафтных зонах края опреде-

ляются эпизоотологическим потенциалом определенного вида грызуна — носителя свойственного ему патогенного хантавируса. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения показателя эпизоотологического потенциала для оценки эпизоотологической и эпидемиологической роли отдельных видов грызунов-носителей хантавирусов в лесных и лугополевых экосистемах при проведении зоологического и эпидемиологического мониторинга в природных очагах хантавирусной инфекции.

Литература

1. Бернштейн А.Д., Апекина Н.С., Коротков Ю.С. и др. // Изменения климата и здоровье населения России в XXI веке. — М., 2004. — С. 105–113.
2. Гавриловская И.Н. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1988.
3. Слонова Р.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом на юге Дальнего Востока России (вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты): автореф. дис. ... докт. мед. наук. — М., 1993.
4. Слонова Р.А., Кушнарева Т.В., Компанец Г.Г. и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2006. — № 3. — С. 74–77.
5. Иванов Л.И., Здановская Н.И., Ткаченко Е.А. и др. // Вopr. вирусол. — 1989. — № 5. — С. 515–518.
6. Онищенко Г.Г. // Вопросы вирусологии. — 1997. — № 4. — С. 148–152.
7. Lee H.W. // Хантавирусы и хантавирусные инфекции. — Владивосток, 2003. — С. 20–42.
8. Schmaljohn C.S., Hjelle B. // Emerg. Infect. Dis. — 1997. — Vol. 3, № 2. — P. 95–104.
9. Tkachenko E., Dekonenko A., Ivanov A. et al. // Emergence and control of rodent-borne viral diseases (Hanta-viral and Arenal Disease). — Paris, 1999. — P. 63–72.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

EPIZOOTOLOGICAL POTENTIAL OF SMALL MAMMALS IN NATURAL FOCI OF HANTAVIRAL INFECTION AND ITS EPIDEMIOLOGICAL IMPORTANCE

T. Kushnaryova

Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences Siberian Branch (Vladivostok)

Summary — A total of 6462 small mammals of 10 species were collected from the Primorye region in 2001–2007 and examined by ELISA and IFA to detect hantavirus antigen and specific antibodies. Hantavirus circulation was revealed in 7 species. Index of epizootological potential (Iep) was offered for evaluation of species of rodents as the potential source of hantavirus in periods of different activity of epizootic process in populations of rodents-reservoirs of etiologic agents of hemorrhagic fever with renal syndrome. Annual epidemic situation in Primorye is determined by epizootological potential of rodent's species of genus *Apodemus* — ecological hosts of pathogenic hantaviruses *Far East* and *Amur*. The results of correlation analysis showed the effectiveness index Iep in carrying out of zoological and epidemic monitoring in natural foci of hantaviral infection.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome, natural foci, small mammals, index of epizootological potential.

УДК 574.3:599.323.4:578.833.29(571.63)

С.Б. Симонов¹, Р.А. Слонова², П.С. Симонов¹, Т.Л. Симонова¹

¹Тихоокеанский институт географии ДВО РАН (г. Владивосток), ²НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

ФОРМИРОВАНИЕ ОЧАГОВ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРИРОДНО-АНТРОПОГЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЛЕСОВ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

Ключевые слова: хантавирусная инфекция, мышевидные грызуны, сукцессии растительности.

Представлены данные об изменении структуры населения мышевидных грызунов — носителей патогенных генотипов/серотипов хантавирусов и их численности в сукцессиях основных растительных формаций, обусловленных антропогенным воздействием (рубки, пожары). Показано, что смены населения грызунов в деградационных сукцессиях нередко приводят к росту потенциальной опасности заражения хантавирусом. Предложенные схемы сопряженной трансформации растительности и населения грызунов могут служить основой для прогноза эпизоотологического и эпидемиологического состояния изучаемой территории.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает в России первое место среди природно-очаговых заболеваний. На Дальнем Востоке в Приморском крае она стоит на одной из первых позиций по тяжести и летальности [9].

Несмотря на пристальное внимание к ряду аспектов распространения ГЛПС, неизученными остаются вопросы формирования природных очагов хантавирусной инфекции под воздействием природно-антропогенных факторов. Территория Приморского края на две трети покрыта лесами, в которых произрастают ценные породы деревьев. Интенсивное использование лесных богатств, сопровождающееся рубками и пожарами, приводит к возникновению разнообразных растительных сообществ, в которых происходит смена населения мышевидных грызунов — резервуара различных генотипов/серотипов хантавируса. Восточно-азиатская (*Apodemus peninsulae*) и полевая (*A. agrarius*) мыши — носители патогенных хантавирусов — представляют серьезную опасность для человека [8]. Данная работа посвящена сравнению населения мышевидных грызунов трансформированных и коренных местообитаний с точки зрения усиления или уменьшения опасности заражения человека хантавирусами на измененных территориях. В этой связи рассмотрена смена сообществ мышевидных грызунов в основных сукцессиях лесных формаций и групп формаций в Приморском крае и дана оценка потенциальной опасности заболевания людей ГЛПС.

Основой для исследования послужили данные учетов мышевидных грызунов, собранные в 1973–2007 гг. во время экспедиционных и стационарных исследований в различных районах Приморского края. При учетах применялась стандартная методика отлова [4]. Всего отработано 182 000 ловушко-линий (от 25 до 100 ловушек в каждой) и добыто 22 654 особей мелких млекопитающих 7 видов, большая часть

которых пришлось на восточно-азиатскую и полевую мышей, красно-серую и красную полевков. Для каждой линии ловушек делалось стандартное геоботаническое описание местообитания.

С целью выявления инфицированности грызунов хантавирусом на разных фазах популяционных циклов проводились эпизоотологические работы на очаговой территории Приморского края в 1995–2007 гг. Всего обследовано 5016 грызунов, от которых взято 26 130 биологических проб. Критерием инфицированности хантавирусом считалось обнаружение специфического антигена в легких с помощью иммуноферментного анализа либо антител в крови животных непрямым методом флюоресцирующих антител. Обработку материала и исследования на выявление антигена и антител проводили согласно существующим методическим рекомендациям [3].

Влияние антропогенной деятельности на активность природных очагов различных болезней привлекала внимание многих исследователей. Тем более что ее последствия зачастую приводили к разнонаправленным результатам. В одних случаях происходило затухание очагов (например, омской геморрагической лихорадки, туляремии, клещевого энцефалита), в других — их активизация, что связывалось с увеличением или уменьшением численности видов грызунов или клещей — носителей возбудителей природно-очаговых болезней [1, 2, 5].

В очагах хантавирусной инфекции в Приморье подобных наблюдений не велось. Известно, что в природных ландшафтах патогенные хантавирусы переносят мыши рода *Apodemus* — *A. agrarius* и *A. peninsulae* [8], которые в отдельные годы с высокой численностью доминируют на очаговой территории. Между численностью данных видов и количеством инфицированных особей существует прямая корреляция [7]. В результате анализа полевого материала удалось показать одну из важнейших, по нашему мнению, закономерность природной очаговости, которой до настоящего времени исследователи не уделяли должного внимания: прямая зависимость между структурой населения мышевидных грызунов и структурой их инфицированной части [6]. Последняя отмечена как для лугово-полевых, так и для лесных ландшафтов края (рис. 1).

Исходя из этого, мы провели оценку потенциальной эпидемической опасности территории края, опираясь на население мышевидных грызунов. Выявленные связи населения грызунов со структурой

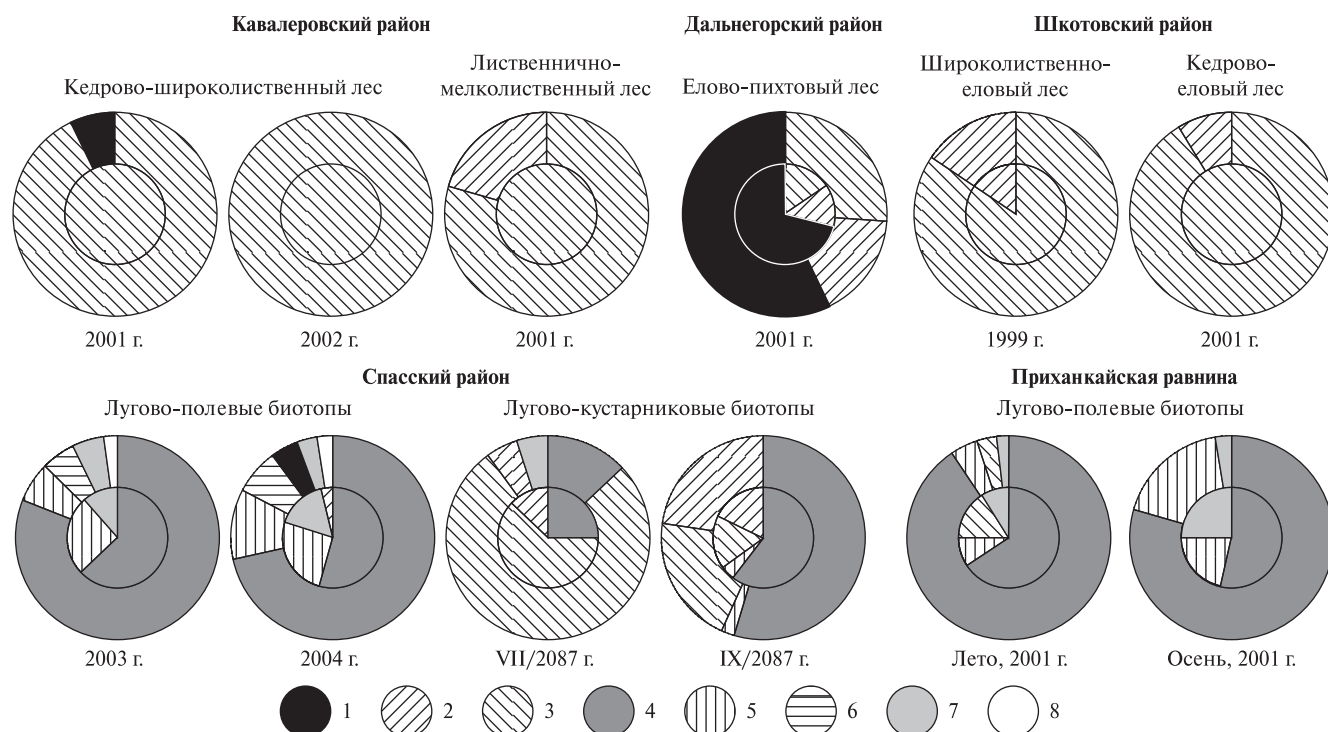


Рис. 1. Структура населения грызунов и ее инфицированной части (внутренний круг).

Виды грызунов: 1 – *C. rutilus*; 2 – *C. rufocanus*; 3 – *A. peninsulae*; 4 – *A. agrarius*; 5 – *M. fortis*; 6 – *C. barabensis*; 7 – *R. norvegicus*; 8 – прочие.

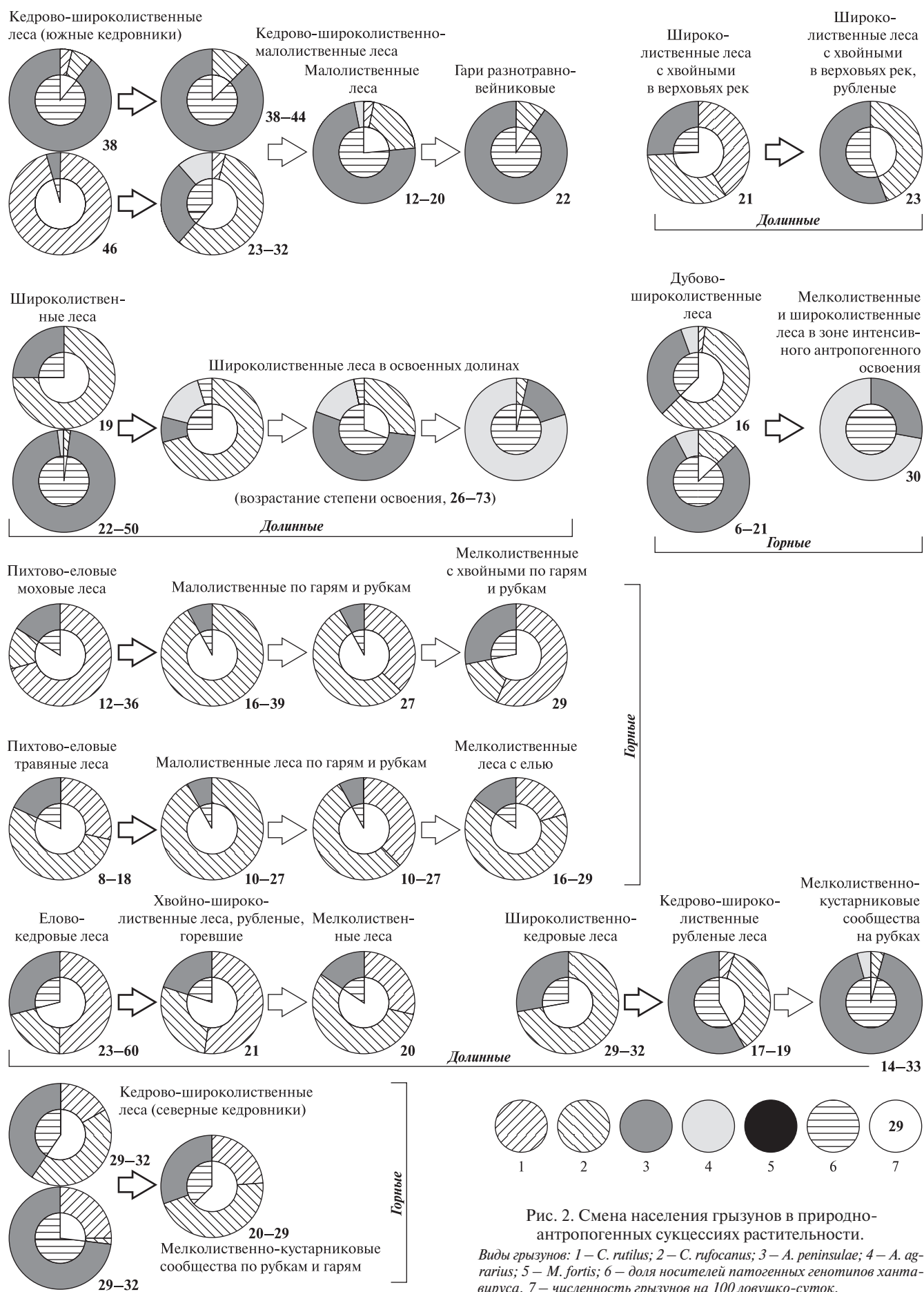
растительного покрова дали возможность создать схемы антропогенной трансформации основных растительных формаций (их групп) и выявить основные тренды в перестройке сообществ мелких млекопитающих – обитателей рассматриваемых растительных сообществ (рис. 2).

Коренные темнохвойные пихтово-еловые леса не оптимальны для восточно-азиатской мыши – носителя патогенного генотипа *Amur*, доля которой в популяции грызунов не превышает 25%. Суммарное обилие грызунов колеблется от 8 до 18 особей на 100 ловушко-суток в травяных ельниках, до 12–36 ловушко-суток – в моховых. После рубок и гарей на начальных стадиях сукцессии в структуре сообществ мышевидных грызунов доля участия восточно-азиатской мыши сокращается до 10–12% при абсолютном доминировании красно-серой полевки. В дальнейшем при восстановлении растительного покрова ситуация меняется мало. При наличии в мелколиственных лесах хвойных пород доля восточно-азиатской мыши может достигать 33%, при этом уловистость грызунов вторичных растительных сообществ находится в пределах, отмеченных для коренных. Исходя из слабо меняющегося типа населения грызунов данных местообитаний, можно говорить, что сукцессии пихтово-еловых лесов оказывают незначительное влияние на возрастание в них эпизоотической напряженности. В елово-кедровых лесах структурные перестройки населения грызунов идут по схеме пихтово-еловых. Однако так как суммарная максимальная численность зверьков в коренных ценозах выше, чем в производных, эпизоотическая напряженность в рубленных елово-кедровых лесах не возрастает.

Усиление опасности заражения хантавирусом наблюдается при смене населения грызунов в сукцессии широколиственно-кедровых лесов, когда доля участия восточно-азиатской мыши в населении увеличивается с 33 в коренных до 90 в производных мелколиственно-кустарниковых сообществах. В последние проникает и полевая мышь, которая в широколиственно-кедровых лесах не встречалась. При этом максимальная численность грызунов коренных лесов и кустарниковых растительных сообществ практически не различается (32 и 33 особей на 100 ловушко-суток).

Территориальные группировки животных кедрово-широколиственных лесов характеризуются поливариантной структурой населения: в них в качестве исходных можно рассматривать сообщества с доминированием красно-серой полевки либо восточно-азиатской мыши. Для мыши неблагоприятные условия при нарушении растительного покрова возникают, как правило, только в северных кедровниках, когда на рубках и гарях доминирующие позиции сохраняются за красно-серой полевкой, а смена населения идет по типу таковой в темнохвойных лесах, без возрастания участия эпидемически значимых видов и при некотором сокращении максимальной уловистости.

В производных местообитаниях регрессионных сукцессий южных кедровников и долинных кедрово-широколиственных лесов, расположенных ниже 600 м над уровнем моря, наблюдается иная картина. Формирование кустарниковых ассоциаций на месте коренных не только не снижает доли восточно-азиатской мыши, но и способствует активному проникновению сюда полевой мыши (2–10% населения).



Однако снижение общей численности грызунов в 1,5–2 раза в мелколиственных лесах и на гарях в конечном итоге приводит к сокращению вирусоносителей патогенных хантавирусов.

Значительный интерес представляют данные по структурным изменениям в населении грызунов наиболее освоенных человеком долинных широколиственных лесов, в которых при возрастании степени освоенности территории доминирующая восточно-азиатская мышь вытесняется полевой. При этом отмечается значительное увеличение численности грызунов (в 3–4 раза), которое может привести к ухудшению эпидемической ситуации.

При смене дубово-широколиственных горных лесов мелколиственно-широколиственными в зоне интенсивного антропогенного влияния повышается потенциальная опасность заражения хантавирусами человека, так как в структуре населения мышевидных грызунов присутствуют два вида — носителя патогенных генотипов/серотипов хантавируса — восточно-азиатская и полевая мыши, при этом их численность увеличивается почти в 2 раза по сравнению с коренными лесами.

Таким образом, трансформации основных растительных формаций и их групп под воздействием природно-антропогенных факторов приводят к перестройке обитающих в них сообществ мелких млекопитающих. В населении грызунов происходят изменения, которые нередко приводят к увеличению численности восточно-азиатской и полевой мышей — носителей патогенных генотипов хантавируса, что в свою очередь повышает опасность заражения хантавирусом на данной территории.

Максимальную опасность представляют сукцессии наиболее освоенных человеком долинных широколиственных, а также дубово-широколиственных горных лесов. В них в зависимости от степени антропогенных воздействий наблюдается значительное увеличение численности двух видов мышей — восточно-азиатской и полевой, доминирующих в структуре населения грызунов и являющихся носителями патогенных генотипов хантавируса. Усиление потенциальной опасности заражения хантавирусом отмечено также в сукцессии широколиственно-кедровых лесов, когда в мелколиственно-кустарниковые сообщества проникают виды, являющиеся резервуаром патогенных хантавирусов.

Перестройки сообществ мышевидных грызунов в сукцессиях темновойных и кедрово-широколиственных лесов происходят таким образом, что потенциальная опасность инфицирования человека хантавирусом в них не возрастает.

Таким образом, в результате проведенного исследования получены важные данные, имеющие теоретическое и практическое значение в аспекте изучения природной очаговости хантавирусной инфекции в Приморском крае:

- представлены данные об изменении структуры населения мышевидных грызунов — носителей пато-

генных генотипов/серотипов хантавирусов и их численности в сукцессиях основных растительных формаций, обусловленных антропогенным воздействием (рубки, пожары);

- показано, что смены населения в деградиционных сукцессиях нередко приводят к росту потенциальной опасности заражения хантавирусом;
- предложенные схемы сопряженной трансформации растительности и населения грызунов могут служить основой для прогноза эпизоотологического и эпидемиологического состояния изучаемой территории.

Литература

1. Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., Савельева Н.А. и др. Природные очаги болезней человека и освоение Восточной части зоны БАМ. — М.: Наука, 1985.
2. Лебедев Е.П., Бусыгин Ф.Ф. // XI Всесоюз. конф. по природной очаговости болезней. — Алма-Ата: Наука, 1984. — С. 28–29.
3. Методы лабораторной диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом: методические рекомендации. — М., 1982.
4. Новиков Г.А. Полевые исследования по экологии наземных позвоночных. — М.: Советская наука, 1953.
5. Олсуфьев Н.Г. // Антропогенное воздействие на условия существования природных очагов болезней человека. — М.: Наука, 1985. — С. 11–23.
6. Симонов С.Б., Симонова Т.Л., Кушнарева Т.В. и др. // Хантавирусы и хантавирусные инфекции. — Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2003. — С. 79–82.
7. Симонов С.Б., Симонова Т.Л., Слонова Р.А. и др. // Дальневосточный журн. инф. пат. — 2006. — № 8. — С. 14–20.
8. Слонова Р.А., Ткаченко Е.А., Иванис В.А. и др. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. — Владивосток, 2006.
9. Ткаченко Е.А., Слонова Р.А., Иванов Л.И. и др. // Природно-очаговые б-ни человека. — Омск, 2001. — С. 22–32.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

FORMATION OF THE RESERVOIRS OF THE HANTAVIRAL INFECTION UNDER THE INFLUENCE OF THE NATURAL-ANTHROPOGENOUS TRANSFORMATION OF WOODS IN PRIMORSKI KRAI

S.B. Simonov¹, R.A. Slonova², P.S. Simonov¹, T.L. Simonova¹

¹ Pacific institute of geography Far-Eastern branch of the Russian Academy of Science (Vladivostok), ² Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok)

Summary — The structures of the population changes in rodents — carriers of pathogenic genotypes/serotypes of hantavirus and their number in successions of the basic vegetative formations caused by anthropogenous influence (fires) are submitted. It is shown, that changes of the population of rodents in degradation successions quite often result in growth of potential danger of Hantavirus infection. The suggested circuits of the connected transformation of vegetation and the population of rodents can form a basis for the forecast epizootic and an epidemiological condition of investigated territory.

Key words: hantavirus infection, rodents, vegetation.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-02:599.323:574.3(571.63)

Т.В. Кушнарева, Р.А. Слонова

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

РОЛЬ ПРЯМОГО ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ХАНТАВИРУСОВ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ СРЕДИ МЫШЕЙ РОДА *APODEMUS*

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирусы, прямой путь передачи, природный очаг.

Представлены данные по многолетней динамике активности эпизоотического процесса и интенсивности внутривидовой агрессии в популяциях грызунов *Apodemus peninsulae* и *Apodemus agrarius* – резервуаров этиологических агентов геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) на территории Приморского края. Прямой путь передачи хантавирусов, ассоциированный с агрессивными контактами в популяциях разных видов рода *Apodemus*, имеет наибольшее значение в весенне-летний период во время высокой численности грызунов, в большей степени среди половозрелых самцов. Наблюдение за уровнем внутривидовой агрессии в популяциях грызунов-носителей патогенных хантавирусов может быть рекомендовано в качестве одного из дополнительных тестов для оценки активности природных очагов ГЛПС.

Род *Hantavirus* (сем. *Bunyaviridae*) включает более 25 серологически и/или генетически отличающихся друг от друга вирусов, каждый из которых в природных условиях эволюционно ассоциирован с одним видом мелких млекопитающих [3, 11]. На юге Дальнего Востока России в природных очагах циркулируют патогенные хантавирусы *Far East* и *Amur* (грызуны-носители – полевая мышь *Apodemus agrarius* и восточно-азиатская мышь *Apodemus peninsulae* соответственно), которые вызывают у людей геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) [2, 14]. Как известно, существование активного очага инфекции возможно лишь при непрерывной циркуляции возбудителя между хозяевами через факторы внешней среды или при непосредственном контакте с инфицированными носителями.

Установлено, что грызуны, инфицированные хантавирусами, обычно не проявляют клинических признаков болезни, являются носителями вируса в течение длительного периода как животные-резервуары и выделяют его с секретами слюнных желез и экскрементами (моча, фекалии) во внешнюю среду с высоким уровнем выделения в первый месяц после заражения [6, 9, 13]. Возможность передачи инфекции непрямой путем через факторы контаминированной окружающей среды показана на примере вирусов *Hantaan* и *Puumala* [4, 8, 10]. Для передачи вируса через инфицированную слюну из-за ее небольшого объема необходимы прямые контакты между грызунами, которые связывают в основном с агрессивными стычками между особями одного вида. В ряде работ сообщалось о трансмиссии патогенных хантавирусов *Puumala* и *Sin Nombre* при агрессивном поведении среди рыжих полевок (*Clethrionomus glareolus*) и оленых мы-

шей (*Peromyscus maniculatus*) соответственно [5, 7, 12]. Данных о роли агрессивных контактов среди мышей рода *Apodemus* в передаче вирусов *Far East* и *Amur* не имеется. Поскольку ГЛПС в настоящее время является одним из наиболее распространенных в Евразии вирусных нетрансмиссивных зоонозов, актуальность исследований различных аспектов эпизоотологии этой инфекции не вызывает сомнения.

Целью настоящей работы было выяснение особенностей, интенсивности и эпизоотологического значения внутривидовой агрессии в популяциях *A. agrarius* и *A. peninsulae* – основных резервуаров патогенных хантавирусов в природных очагах на территории Приморского края.

Для характеристики активности эпизоотии хантавирусной инфекции в популяциях мышей рода *Apodemus* использованы материалы многолетних зоологических и эпизоотологических исследований, проведенных на очаговых территориях Приморского края. Всего было отловлено 13 647 мышевидных грызунов шести видов, в том числе 6940 – полевых и 3193 – восточно-азиатских мышей. При регистрации внутривидовой агрессии обследовано 3346 экземпляров грызунов рода *Apodemus*, из них 2250 – полевых и 1096 – восточно-азиатских мышей, отловленных на стационарных участках в типичных местах обитания этих видов грызунов. Ежегодную активность эпизоотического процесса в популяциях грызунов-носителей оценивали с помощью следующих показателей:

- 1) процентная доля данного вида грызуна в отлове;
- 2) процент антигенположительных зверьков от особей данного вида и от всех инфицированных в отлове;
- 3) средней геометрического титра (СГТ) антигена в $\log_2$ для данного вида.

Детекцию хантавирусного антигена в 10% суспензии ткани легкого и других органов грызунов проводили с помощью иммуноферментного анализа, используя коммерческую тест-систему «Хантагност» производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН (г. Москва). Присутствие антител к хантавирусам в сыворотках крови и/или настоях сердец грызунов выявляли с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител по общепринятой методике, используя в качестве вторичных антител антивидовые иммуноглобулины, меченные ФИТЦ, производства Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (г. Москва). Индекс avidности специфических антител определяли

Таблица 1

Сезонная динамика относительного показателя внутривидовой агрессии в популяциях мышевидных грызунов

Вид грызуна	Сезон отлова	Кол-во обследованных				ОПва, М±m	
		всего		с порванными ушами		самцы	самки
		самцы	самки	самцы	самки		
Род <i>Apodemus</i>	Весна	428	427	87	71	20,3±1,9	16,6±1,8
	Лето	657	496	80	42	12,2±1,3	8,5±1,2
	Осень	600	564	40	31	2,3±0,6	5,5±0,9
<i>Apodemus agrarius</i>	Весна	332	290	64	47	19,3±2,3	16,2±2,2
	Лето	320	235	32	20	10,0±1,7	8,5±1,8
	Осень	457	440	30	19	6,6±1,2	4,3±1,0
<i>Apodemus peninsulae</i>	Весна	96	137	23	24	24,0±4,3	17,5±3,2
	Лето	337	261	48	22	14,2±1,9	8,4±1,7
	Осень	143	124	12	10	8,4±2,3	8,0±2,4

по разнице в титре антител до и после обработки препаратов-слайдов 8М раствором мочевины (Hedman et al., 1991). На момент отлова активными вирусоносителями считали зверьков с наличием антигена хантавируса в легком и/или антител низкой avidности в крови.

Возможность выделения возбудителя хантавирусной инфекции во внешнюю среду из организма природного хозяина со слюной устанавливали с помощью молекулярно-генетических исследований по обнаружению вирусной РНК в органах секреции *A. peninsulae* и *A. agrarius*. Общую РНК экстрагировали из органов, взятых от антиген- и серопозитивных мышей. Для выделения суммарной РНК использовали набор реагентов «ВекторНК-экстракция». Выявление вирусной РНК проводили с помощью реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с последующей визуальной индикацией продуктов методом гель-электрофореза в 1,2% агарозном геле в присутствии бромида этидия с использованием тест-системы «Вектор-Ханта-РНК-ампли». Полимеразно-цепную реакцию проводили в nested-варианте, используя набор из 4 праймеров S-гена, группоспецифичных к вирусам *Hantaan* и *Amur*.

Проявление прямых агрессивных контактов среди грызунов в наших исследованиях регистрировалось с помощью метода подсчета особей с порванными ушами (статус «порванные уши»), при этом учитывался тот факт, что выемки на кромке ушной раковины в результате агрессивных стычек имеют рваный вид, в случае присасывания личинок и нимф иксодовых клещей — округлый. Применение этого метода было обусловлено данными экспериментов по ссаживанию мышевидных грызунов одного и разных видов [1], которые показали, что в результате внутривидовых стычек наиболее часто страдает целостность ушной раковины, в то время как межвидовые контакты мышевидных грызунов, по сравнению с внутривидовыми, принципиально реже приводят к агрессивным погрызам. За относительный показатель внутривидовой агрессии (ОПва) принималось число особей со статусом «порванные уши» в пересчете на 100 обследованных особей данной популяции грызунов.

Определение доверительной вероятности (Р) проводили по таблице критерия Стьюдента (t). Статистически достоверными различия считали при $P < 0,05$. Данные представлены как средняя величина плюс-минус стандартное отклонение. Корреляционную связь выявляли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена, используя программный пакет Statistica.

Анализ активности эпизоотического процесса на разных фазах популяционной динамики экологически разных видов грызунов рода *Apodemus* показал, что периоды низкой активности эпизоотического процесса в популяциях полевой мыши, как правило, совпадали с периодами высокой активности эпизоотии в популяциях восточно-азиатской мыши. В популяциях восточно-азиатской мыши в интенсивности эпизоотии наблюдалась 3–4-летняя цикличность, при этом периоды ее высокой активности отмечены в фазу пика численности грызунов. Процент антигенпозитивных особей в эти годы составил в среднем $14,7 \pm 0,9\%$, СГТ антигена — $4,5 \log_2$. В годы низкой активности эпизоотии, наблюдавшейся, как правило, в фазу депрессии численности грызунов, процент антигенпозитивных особей в среднем составил $1,9 \pm 0,2\%$, СГТ антигена — $1,7 \log_2$. В динамике эпизоотического процесса в популяциях полевой мыши отмечена более сложная цикличность: выраженный пик активности на фоне менее значительных 2–3-летних ее подъемов и периодов спада. В год выраженного пика число антигенпозитивных особей составило $12,8 \pm 0,7\%$, а СГТ антигена — $4,7 \log_2$. В годы спада активности эпизоотии показатели были гораздо ниже: доля антигенпозитивных особей — $2,8 \pm 0,3\%$, СГТ антигена — $1,6 \log_2$.

При анализе многолетней динамики интенсивности прямых агрессивных контактов в популяциях *A. agrarius* и *A. peninsulae*, отличающихся сезонным разграничением местообитания [1], средний относительный показатель внутривидовой агрессии для *A. agrarius* составил $10,4 \pm 0,6$, для *A. peninsulae* — $13,5 \pm 1,0$. При этом среднегодовые значения ОПва варьировали в широких пределах: в популяциях

Таблица 2

Относительный показатель внутривидовой агрессии в разных возрастно-функциональных группах грызунов рода *Apodemus*

Вид, группа	Кол-во грызунов		ОПва, $M \pm m$
	всего	с порванными ушами	
<i>A. agrarius</i>	2250	235	10,4±0,6
Неполовозрелые	925	24	2,6±0,5
в т.ч. самцы	473	7	1,5±0,6
самки	452	17	3,8±0,9
Половозрелые	1325	211	15,9±1,0
в т.ч. самцы	738	128	17,3±1,4
самки	587	83	14,1±1,4
<i>A. peninsulae</i>	1096	148	13,5±1,0
Неполовозрелые	454	23	5,1±2,0
в т.ч. самцы	214	7	3,3±1,2
самки	240	16	6,7±1,6
Половозрелые	642	125	19,5±3,1
в т.ч. самцы	360	73	20,3±2,1
самки	282	52	18,4±2,3

полевой мыши — от 7,4±1,9 до 15,6±2,5, в популяциях восточно-азиатской мыши — от 6,3±2,0 до 27,9±2,3.

Выявлена прямая тесная связь между интенсивностью внутривидовой агрессии и динамикой популяционной численности грызунов рода *Apodemus* с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена ($r=0,9478$). Значения ОПва в годы пика/спада численности и годы депрессии/начала подъема численности составили в популяциях *A. agrarius* 12,5±0,8 и 7,6±1,3 соответственно, в популяциях *A. peninsulae* — 18,8±1,6 и 6,3±2,5 соответственно.

При изучении сезонной динамики интенсивности внутривидовой агрессии в популяциях обоих видов грызунов рода *Apodemus* получена сходная картина: максимальные значения ОПва регистрировались весной, более низкие — летом и минимальные — осенью (табл. 1). Весной значение этого показателя было достоверно выше, чем летом и осенью: в популяциях *A. agrarius* — в 1,9 и 3,2 раза, в популяциях *A. peninsulae* — в 1,7 и 2,5 раза соответственно. При этом отмечено, что среднегодовые сезонные значения ОПва в популяциях *A. peninsulae* были выше, чем в популяциях *A. agrarius*.

У обоих видов рода *Apodemus* особи со статусом «порванные уши» значительно чаще встречались в группах половозрелых самцов и самок по сравнению с группами самцов и самок, не достигших этого состояния (табл. 2). Среди незрелых особей объектами агрессии чаще становились самки, в то время как в группе зрелых особей средний много-

летний ОПва у самцов был выше, чем у самок. Отмечено, что во всех возрастно-функциональных группах (зрелые самцы, зрелые самки, незрелые самцы, незрелые самки) среднее значение ОПва было выше у *A. peninsulae*, чем у *A. agrarius*.

При сравнительном анализе инфицированности грызунов с разным состоянием целостности ушной раковины выявлены достоверные различия между группой особей с порванными ушами и группой особей с целыми ушами по показателю их инфицированности (табл. 3). Суммарная инфицированность мышей обоих видов рода *Apodemus* в группе особей со статусом «порванные уши» (20,9±2,1%) превышала таковую в группе особей с целыми ушами (9,4±1,1%) в 2,2 раза. При этом инфицированность грызунов с порванными ушами была выше инфицированности грызунов с целыми ушами в популяциях *A. agrarius* в 2,1 раза (18,7±2,5 и 8,8±0,6% соответственно), в популяциях *A. peninsulae* — в 2,3 раза (24,3±3,5 и 10,7±1,0% соответственно).

Свидетельством острой стадии инфекции на момент отлова у грызунов с разным состоянием целостности ушной раковины могут служить данные вирусологических и молекулярно-генетических исследований: обнаружение антигена хантавируса и вирусной РНК в слюнных железах и органах выделения, а также присутствие специфических антител низкой avidности в крови у инфицированных мышей. В период острого проявления инфекции с активной диссеминацией вируса с секретами и экскретами во внешнюю среду распространение хантавирусов *Amur* и *Far East* в популяциях их природных хозяев, по-видимому, может происходить через горизонтальную трансмиссию, по всей вероятности, и при прямых контактах, в том числе при агрессивных взаимодействиях через инфицированную слюну.

Результаты исследований показали, что на интенсивность внутривидовой агрессии среди мышей рода *Apodemus* оказывают заметное влияние демографические, популяционные и сезонные факторы. Более широкий диапазон и высокие значения ОПва у *A. peninsulae* по сравнению с *A. agrarius*, по-видимому, связаны с резкими колебаниями популяционной численности грызунов этого вида, обусловленными в значительной степени кормовыми и погодными

Таблица 3

Инфицированность мышей рода *Apodemus* с порванными и целыми ушами

Вид и пол	Кол-во грызунов					
	с порванными ушами			с целыми ушами		
	всего	инфицированных	инфицированность, % ($M \pm m$)	всего	инфицированных	инфицированность, % ($M \pm m$)
<i>A. agrarius</i>	235	44	18,7±5,1	2015	178	8,8±1,2
Самцы	135	30	22,2±7,1	1076	108	10,0±1,8
Самки	100	14	14,0±6,9	939	70	7,4±1,8
<i>A. peninsulae</i>	148	36	24,3±7,0	948	102	10,7±2,0
Самцы	80	25	31,2±10,4	494	68	13,8±3,1
Самки	68	11	16,2±8,9	454	34	7,5±2,4

факторами в разных ландшафтных зонах Приморского края. Так, по данным многолетних стационарных наблюдений, относительная численность полевой мыши в годы пика доходила до 15, а в годы депрессий не опускалась ниже 6 особей в пересчете на 100 ловушко-суток. Средняя относительная численность восточно-азиатской мыши в годы пика составила 22 особи, в годы депрессии — 1–2 особи на 100 ловушко-суток, то есть амплитуда колебания превышала двадцатикратную отметку. Согласно полученным данным, половозрелые особи в весенний и летний сезоны в структуре популяций мышей рода *Apodemus* составляли $95,8 \pm 0,9$ и $76,4 \pm 1,0\%$ соответственно, а в группе особей со статусом «порванные уши» — $99,5 \pm 0,6$ и $90,5 \pm 2,6\%$ соответственно. Ранее в экспериментальных исследованиях также были отмечены более частые агрессивные взаимодействия между зверьками одного вида мышевидных грызунов весной и летом в период размножения, чем осенью и зимой [1].

На основании данных по инфицированности зверьков с разным состоянием целостности ушной раковины можно предположить, что агрессивные контакты могут являться одним из механизмов прямой передачи хантавирусов в популяциях мышей рода *Apodemus*, в большей степени в весенне-летний период в фазу пика численности грызунов. Инфицированная часть популяций *A. agrarius* и *A. peninsulae* в весенне-летний период была представлена в основном половозрелыми особями ($95,6 \pm 2,1\%$), среди которых преобладали самцы ($57,9 \pm 5,1\%$). Процент активных вирусоносителей среди особей со статусом «порванные уши» в фазы пика и депрессии численности составил в популяциях полевой мыши $29,2 \pm 5,4$ и $9,9 \pm 3,5$ соответственно, в популяциях восточно-азиатской мыши — $44,2 \pm 6,9$ и $17,0 \pm 5,5$ соответственно. Агрессивные стычки имели место на всех фазах популяционного цикла, создавая благоприятные условия для передачи хантавирусов через слюну среди грызунов, даже во время депрессии их численности. Однако прямой путь передачи, ассоциированный с агрессивным поведением зверьков, по всей вероятности, играет значимую роль во время высокой численности, способствующей более частым контактам неинфицированных чувствительных животных с активными вирусоносителями.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об определенном участии прямого контактного пути трансмиссии хантавирусов *Amur* и *Far East*, ассоциированного с агрессивным поведением их экологических хозяев, в поддержании природных очагов ГЛПС на территории Приморского края. Прямой путь передачи патогенных хантавирусов в популяциях экологически разных видов рода *Apodemus* имеет наибольшее значение в весенне-летний период в годы высокой популяционной численности *A. agrarius* и *A. peninsulae*, в большей степени среди половозрелых самцов. Наблюдение за уровнем внутривидовой агрессии в популяциях гры-

зунов-носителей патогенных хантавирусов может быть рекомендовано в качестве одного из дополнительных тестов для оценки активности природных очагов ГЛПС.

Литература

1. Косой М. Е. Эколого-эпидемиологическая характеристика природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом : дис. ... канд. биол. наук. — М., 1987.
2. Слонова Р. А., Кушнарева Т. В., Компанец Г. Г. и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. — 2006. — № 3. — С. 74–77.
3. Ткаченко Е. А., Деконенко А. Е., Дзагурова Т. К. и др. // Хантавирусы и хантавирусные инфекции / под ред. Р. А. Слоновой и В. А. Иванис. — Владивосток, 2003. — С. 56–78.
4. Bernshtein A. D., Apekina N. S., Mikhailova T. V. et al. // Arch. Virol. — 1999. — Vol. 144. — P. 2415–2428.
5. Escutenaire S., Chalon P., De Jaegere F. et al. // Emerg. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 8 — P. 930–936.
6. Gavrilovskaya I. N., Apekina N. S., Bernshtein A. D. et al. // Arch. Virol. — 1990. — Suppl. 1. — P. 57–62.
7. Hinson E. R., Shone S. M., Zink M. C. et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2004. — Vol. 70 — P. 310–317.
8. Kallio E. R., Klingstrum J., Gustafsson E. et al. // J. Gen. Virol. — 2006. — Vol. 87. — P. 2127–2134.
9. Kariwa H., Fujiki M., Yoshimatsu K. et al. // Arch. Virol. — 1998. — Vol. 143. — P. 365–374.
10. Lee H. W., Lee P. W., Baek L. J. et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 1981. — Vol. 30. — P. 1106–1112.
11. Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. // J. Gen. Virol. — 1996. — Vol. 77. — C. 2677–2687.
12. Root J. J., Calisher G. H., Beaty B. J. // Wildl. Dis. — 1999. — Vol. 35. — P. 311–318.
13. Safronetz D., Lindsay R., Dibbernardo A. // Vector Borne Zoonotic. Dis. — 2005. — Vol. 5, No. 2. — P. 127–132.
14. Yashina L., Patrushev N., Ivanov A. et al. // Virus. Res. — 2000. — Vol. 70. — P. 31–44.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

ROLE OF DIRECT TRANSMISSION OF HANTAVIRUSES — AGENTS OF HFRS IN POPULATIONS OF APODEMUS RODENTS

T. Kushnaryova, R. Slonova

Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences Siberian Branch (Vladivostok)

Summary — Long-term dynamics of activity of epizootic process and intensity of intraspecific aggression was studied in *Apodemus peninsulae* and *Apodemus agrarius* rodent populations — reservoirs of etiologic agents of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Primorye region. It has been shown that the direct transmission mode of hantaviruses, associated with aggressive contacts in populations of different *Apodemus* rodents, is more significant in spring-summer season in the time of temporal high population number, largely among sexual maturity males. Observation of the level of intraspecific aggression in populations of hantavirus rodent-host may be recommended as one of the additional tests to assess the activity of HFRS natural foci.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome, hantaviruses, direct transmission, natural foci.

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 *Puumala*-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	— ³	н.и.	
Щ-4605	Больной человек	100,0	19,0 (21,0 ²)	44,3	18,2	н.и.	
З-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.

З-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, З-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 З-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 авидности.

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 KI-262, выделенный от серой крысы, отловленной в эндемичном 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 *Hantaan*-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 *Seoul*-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., van der 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 SR11 virus *Seoul* that can be connected to distinctions at their genome level.

Key words: hantavirus infection, genotype, viral activity.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 61–64.

УДК 616.986.7-036.22:599.323(571.63)

Е.А.Зайцева¹, С.А. Ермолаева², Г.П.Сомов¹

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток), ²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (г. Москва)

РАСПРОСТРАНЕНИЕ *LISTERIA MONOCYTOGENES* СРЕДИ МЫШЕВИДНЫХ ГРЫЗУНОВ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Ключевые слова: листерии, мышевидные грызуны, факторы патогенности, интернарины.

Изучено распространение бактерий рода *Listeria* среди мышевидных грызунов, отловленных на территории Приморского края, и выявлены отдельные факторы патогенности возбудителя, необходимые на определенных этапах инфекции и приводящие к персистенции его в организме грызунов. Отмечено, что среди обследованных особей листерии были обнаружены у полевой мыши, красно-серой полевки, восточно-азиатской мыши, красной полевки. В группе животных по показателю инфицированности листериями доминировала полевая мышь (*Apodemus agrarius*), обитающая на равнинной территории Приморского края, от которой чаще всего выделялся патогенный для человека и животных вид *L. monocytogenes*. Исследования показали существование эпизоотического процесса листериоза в популяции мышевидных грызунов на территории Приморского края, которые при определенных условиях могут явиться источником инфекции.

Грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes*, возбудитель листериоза, широко распространена в окружающей среде и выделена более чем у 100 видов различных животных (сельскохозяйственных, домашних, диких). В настоящее время доказано, что одним из источников листериозной инфекции для человека служат дикие грызуны и сельскохозяйственные животные. При попадании в макроорганизм эти бактерии вызывают развитие заболевания, которое обусловлено продукцией ими белковых факторов патогенности, позволяющих листериям проникать и паразитировать в эукариотических клетках (белки-интернарины InlA, InlB, Auto, ActA, листериолизин и др.) [12, 14].

Многие ученые проводят исследования на зараженность листериями грызунов и других диких животных, которым отводится важная роль в инфицировании окружающей среды и формировании природных очагов инфекции [2, 3, 7, 8, 11]. Известно, что как у людей, так и у животных может иметь место бессимптомное листериозное носительство [12, 13, 14]. При исследовании мышевидных грызунов, отловленных на Европейской территории России (домовые мыши, серые крысы, полевые мыши, рыжие полевки), были получены положительные результаты на листериоз в 0,14% случаях, а пробы, взятые на плодовоовощных базах (смывы, погрызенные овощи), были положительными в 3,3% случаях [8]. В Читинской области в естественных условиях заражение листериями найдено у многих видов мелких млекопитающих (тарбаган, суслик даурский, полевки разных видов — Брандта, стадная, восточная, красно-серая, унгульская и монгольская, мышь домовая) и

насекомых (блохи), а также субстрата и почвы гнезд грызунов, погадок хищных птиц [11]. Общая инфицированность *L. monocytogenes* грызунов колеблется, по данным этих авторов, от 0,001 до 0,1%. Отмечено, что чаще эпизоотии протекают среди полевков [11]. Имеются сообщения о выделении *L. monocytogenes* от грызунов в г. Новороссийске [2].

Вопрос о циркуляции этого возбудителя среди грызунов на Дальнем Востоке до сих пор изучен недостаточно. В то же время известно, что территория Приморского края является эндемичной по ряду природно-очаговых инфекций, в том числе по геморрагической лихорадке с почечным синдромом, туляремии, лептоспирозу, а основными носителями этих патогенов являются мышевидные грызуны [1, 9].

Цель исследования — изучить распространение бактерий рода *Listeria* среди мышевидных грызунов на территории Приморского края и выявить отдельные факторы патогенности, необходимые на определенных этапах инфекции и приводящие к персистенции возбудителя в организме у грызунов.

Исследованы пробы органов (печень, селезенка, лимфатические узлы, кишечник) от 654 грызунов, которые были отловлены в течение 2004–2005 гг. в различных биотопах (хвойно-широколиственных и смешанных лесах в долинах ручьев и рек, прирусловых комплексах, вейнико-полинных разнотравных лугах и т.д.) на территории трех районов (Спасского, Надеждинского и Шкотовского) Приморского края. Микробиологические исследования проводились на средах с использованием методов, рекомендованных ГОСТ Р 51921-2002 и МУК 4.2.1122-02 для выявления листерий, а также с использованием питательных сред в авторской разработке [5].

Антигенные свойства культур определяли в линейной реакции агглютинации с помощью типовой поливалентной и моновалентных (I и IV серотипов) листериозных сывороток, изготовленных во ВНИИВВиМ (г. Покров). Для фаготипирования *L. monocytogenes* использовали набор бактериофагов, включающий фаги L-2А и L-4А (ВНИИВВиМ, г. Покров).

Антибиотикорезистентность штаммов определяли методом дискодиффузии в агар с применением стандартных бумажных дисков с антибиотиками, производства Научно-исследовательского центра фармакотерапии (г. Санкт-Петербург), согласно МУК 4.2.1890-04. В качестве питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов

Таблица 1

Виды грызунов – носителей бактерий рода *Listeria* на территории Приморского края

№ штамма	Вид листерий	Год выделения	Вид грызуна	Латинское название	Место выделения
VIMVR062	<i>L. monocytogenes</i>	2004	Полевая мышь	<i>Apodemus agrarius</i>	Спасский р-н
VIMVR063	<i>L. monocytogenes</i>	2004	Полевая мышь	<i>Apodemus agrarius</i>	Спасский р-н
VIMVR079	<i>L. innocua</i>	2004	Полевая мышь	<i>Apodemus agrarius</i>	Надеждинский р-н
VIMVR081	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Красно-серая полевка	<i>Myodes rufocanus</i>	Шкотовский р-н
VIMVR082	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Красно-серая полевка	<i>Myodes rufocanus</i>	Шкотовский р-н
VIMVR083	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Красно-серая полевка	<i>Myodes rufocanus</i>	Шкотовский р-н
VIMVR084	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Полевая мышь	<i>Apodemus agrarius</i>	Шкотовский р-н
VIMVR085	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Полевая мышь	<i>Apodemus agrarius</i>	Шкотовский р-н
VIMVR086	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Полевая мышь	<i>Apodemus agrarius</i>	Шкотовский р-н
VIMVR087	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Полевая мышь	<i>Apodemus agrarius</i>	Шкотовский р-н
VIMVR088	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Красно-серая полевка	<i>Myodes rufocanus</i>	Шкотовский р-н
VIMVR089	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Красно-серая полевка	<i>Myodes rufocanus</i>	Шкотовский р-н
VIMVR090	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Полевая мышь	<i>Apodemus agrarius</i>	Шкотовский р-н
VIMVR091	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Полевая мышь	<i>Apodemus agrarius</i>	Шкотовский р-н
VIMVR092	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Восточно-азиатская мышь	<i>Apodemus peninsulae</i>	Шкотовский р-н
VIMVR093	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Восточно-азиатская мышь	<i>Apodemus peninsulae</i>	Шкотовский р-н
VIMVR094	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Красно-серая полевка	<i>Myodes rufocanus</i>	Шкотовский р-н
VIMVR095	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Красно-серая полевка	<i>Myodes rufocanus</i>	Шкотовский р-н
VIMVR096	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Красно-серая полевка	<i>Myodes rufocanus</i>	Шкотовский р-н
VIMVR097	<i>L. monocytogenes</i>	2005	Красно-серая полевка	<i>Myodes rufocanus</i>	Шкотовский р-н
VIMVR172	<i>L. ivanovii</i>	2006	Красная полевка	<i>Myodes rutilus</i>	Спасский р-н

к антибиотикам использовали агар Мюллера-Хинтон (BioMérieux, Франция).

При проведении работ с экспериментальными животными выполнялись все правила, предусмотренные приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.

Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали бактериальные лизаты, приготовленные, как описано Е.А. Зайцевой и др. [6]. Молекулярно-генетическое типирование штаммов проводили с помощью тест-системы Ампли-Сенс *Listeria monocytogenes* (г. Москва) по программе фирмы-изготовителя. Определение генов, кодирующих белки-интерналы А, В и С, осуществляли с использованием праймеров, указанных Е.А. Зайцевой и др. [4], а гена *auto* – с праймерами *autoF*-5'-AAGTTGCGCGTGAAGAAATGC; *autoR*-5'-GTGTTGACGTACCTACCTGTT; гена *actA* – с праймерами *actAF*-5'-AGGAAGGCGACTGGGGCGGAG, *actAR*-5'-TGGAATTCGAATGAGCTCGG. Нуклеотидные последовательности открытых рамок считывания генов, кодирующих интерналы, а также белки ActA, Auto были получены из базы данных ListiList (<http://www.pasteur.fr>), содержащей последовательность генома штамма EGDe, который был использован в данной работе как положительный контроль. Праймеры были выбраны в 5' и 3' областях открытых рамок считывания с помощью программы Oligo 38. ПЦР осуществляли на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Москва) по следующей программе:

1) для пар праймеров *inlAF*–*inlAR*, *inlBF*–*inlBR*, *inlCF*–*inlCR*, как указано Е.А. Зайцевой и др. [4];
2) для пары праймеров *autoF*–*autoR* – 1-й цикл – 94°C, 2 мин; 5 циклов – 94°C, 20 с, 50°C, 20 с, 72°C, 20 с; 25 циклов – 94°C, 5 с, 50°C, 5 с, 72°C, 5 с;

3) для пары праймеров *actAF*–*actAR* – 1-й цикл – 94°C, 2 мин; 5 циклов – 94°C, 20 с, 55°C, 20 с, 72°C, 20 с; 25 циклов – 94°C, 5 с, 55°C, 5 с, 72°C, 5 с.

Продукты реакции разделяли на 1% агарозном геле в буфере TAE и окрашивали бромистым этидием.

Микробиологическим методом была выделена 21 культура бактерий, относящихся к роду *Listeria*, 19 из которых были идентифицированы как *L. monocytogenes* и по одной культуре – как *L. innocua* и *L. ivanovii* (табл. 1). Среди обследованных грызунов, отловленных на территории Приморского края, листерии были обнаружены у полевой мыши, красно-серой полевки, восточно-азиатской мыши, красной полевки. От полевой мыши выделено два вида листерий – *L. monocytogenes* и *L. innocua*, от красной полевки – только один вид *L. ivanovii*. Носителями патогенного вида *L. monocytogenes* оказались мышевидные грызуны рода *Apodemus* (полевая и восточно-азиатская мыши) и лесные полевки рода *Myodes* (красно-серые полевки).

Известно, что существование микроба в определенной экологической нише (хозяине) и при определенной температуре влияет на его биологические свойства, что может сказываться на морфологии колоний, особенностях роста, активности ряда ферментов, антигенной структуре и вирулентности возбудителя [10]. С этой целью у всех штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из органов грызунов, изучались биологические свойства. По морфологии среди культур чаще встречались кокки, палочки и реже – овоидные формы бактерий, которые окрашивались по Граму положительно. Все штаммы *L. monocytogenes*, изолированные от грызунов, были подвижны при 20–22°C, а 42% культур – неподвижны при 37°C. Все изоляты *L. monocytogenes* были оксидазоотрицательными. На

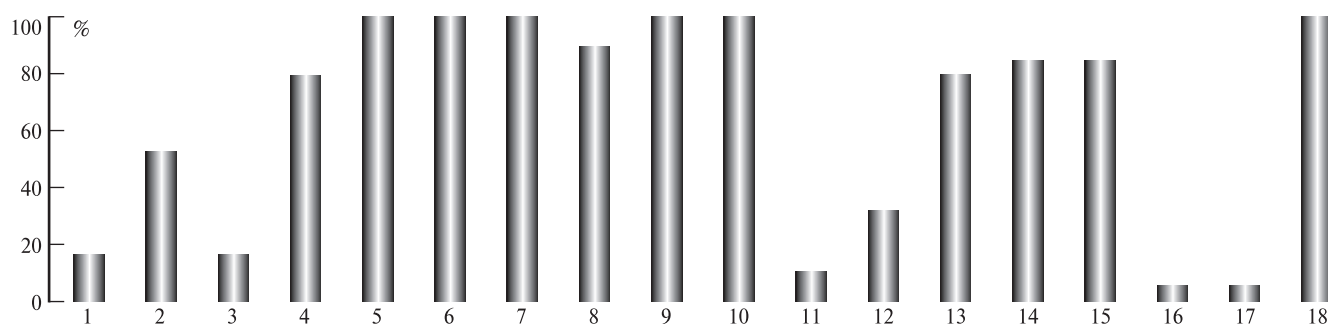


Рис. Резистентность к антимикробным препаратам штаммов *L. monocytogenes*, изолированных от грызунов в Приморском крае. 1 – эритромицин, 2 – азитромицин, 3 – амикацин, 4 – цефалексин, 5 – цефуроксим, 6 – цефотаксим, 7 – цефтазидим, 8 – цефеперазон, 9 – цефтриаксон, 10 – налидиксовая кислота, 11 – офлоксацин, 12 – норфлоксацин, 13 – пefлоксацин, 14 – ципрофлоксацин, 15 – ломефлоксацин, 16 – левофлоксацин, 17 – хлорамфеникол, 18 – полимиксин.

кровяном агаре у 94,7% культур *L. monocytogenes* отмечалась зона β -гемолиза.

При изучении биохимических свойств 100% культур *L. monocytogenes* разлагали до кислоты без газа эскулин, глюкозу, фруктозу, рамнозу, маннозу, лактозу, мальтозу, галактозу, салицин, мелецитозу и не разлагали ксилозу, маннит, мелибиозу, раффинозу, мочевины, дульцит, адонит и крахмал. По отношению к двум сахарам (арабинозе и сахарозе) они показали вариабильные результаты: 10,5% культур ферментировали арабинозу, 52,6% – сахарозу. У всех изучаемых культур листерий отмечалась отрицательная метил-рот-реакция и реакция Фогес-Проскауэра на полужидком агаре (0,3%).

Таким образом, анализ ферментации углеводов и спиртов у штаммов *L. monocytogenes*, изолированных из органов грызунов, подтвердил относительную стабильность и однородность биохимических свойств этих бактерий, что, возможно, объясняется их хорошо выраженной адаптационной способностью к существованию в данных видах макроорганизмов.

Для более четкой идентификации и биологической характеристики выделенных из органов грызунов культур проведено фаготипирование штаммов *L. monocytogenes*. Чувствительными к бактериофагам L-2A и L-4A оказались 78,9% штаммов, из них 21% культур типировались фагом L-2A, а 57,9% – фагом L-4A.

L. monocytogenes в 100% случаев агглютинировались поливалентной листериозной сывороткой. Все штаммы типировались моноспецифическими листериозными сыворотками и по антигенной структуре 40,7% из них относились к серотипу I и 59,3% – к серотипу IV.

В процессе адаптации бактерий к определенным условиям существования немаловажное значение отводится их резистентности к антибиотикам [3]. В настоящее время установлено, что в связи с усилением генетического обмена плазмидами полиантибиотикорезистентности между циркулирующими штаммами различные виды бактерий могут приобретать и новые признаки, ранее не характерные для той или иной таксономической группы. Используя дискодиффузионный метод, нами был проведен анализ антибиотикорезистентности изолятов *L. monocytogenes*, который показал, что все штаммы оказались резистентными к

цефалоспорином II и III поколения (цефуроксиму и цефтазидиму, цефотаксиму, цефтриаксону соответственно), налидиксовой кислоте и полимиксину. Высокий уровень резистентности *L. monocytogenes* был обнаружен к цефалоспорином I (цефалексину) и III поколений (цефеперазон), а также фторхинолонам – пefлоксацину, ломефлоксацину, ципрофлоксацину (рис.). Все исследуемые культуры обладали полиантибиотикорезистентностью: 26,3% изолятов были резистентны к 10, 26,3% – к 11, 21% – к 9, 10,5% – к 13 препаратам, по 5,3% изолятов листерий – к 8, 12 и 15 антимикробным препаратам соответственно.

В последние годы достигнут существенный прогресс в изучении факторов патогенности листерий, их роли на различных этапах инфекционного процесса, наличия генов, определяющих их синтез, а также механизмов регуляции их экспрессии [12, 14].

У всех культур *in vitro* изучен ряд ферментов, которые могут участвовать в развитии инфекционного процесса – каталаза, гиалуронидаза, ДНКазы, лецитиназа, липолитическая активность (табл. 2). Все штаммы *L. monocytogenes* были каталазоположительными, показали липолитическую активность на средах, содержащих твин 20, 60, 80, лецитиназу на среде ГРМ № 1 с активированным углем, ДНКазу. Гиалуронидаза была отмечена у 89,5% культур.

Выделенные из органов грызунов культуры *L. monocytogenes* были проанализированы с помощью полимеразной цепной реакции на присутствие генов, кодирующих факторы адгезии и инвазии, относящиеся к семейству интерналинов, а также генов actA и auto. На ДНК всех исследованных штаммов *L. monocytogenes* был получен продукт предсказанного размера. Сравнительный анализ по выявлению генов inlA, inlB, inlC у *L. monocytogenes* от грызунов, циркулирующих в данном географическом регионе, показал, что все изучаемые культуры обладали этими генами. Интересные результаты получены при выявлении генов, кодирующих белки ActA и Auto. У всех без исключения штаммов *L. monocytogenes* был обнаружен ген, кодирующий белок ActA, тогда как ген, кодирующий белок Auto, не выявлялся.

У штаммов, выделенных из органов грызунов на территории Приморского края, исследовалась *in vivo*

Таблица 2

Факторы патогенности у культур *L. monocytogenes*, изолированных от грызунов в Приморском крае

№ штамма	Ферменты								Гемолиз	Гены, кодирующие белки					Вирулентность для животных		
	Каталаза	ДНКаза	Гиалуронидаза	Липаза			Лецитиназа (на среде ГРМ №1)			InlA	InlB	InlC	ActA	Auto	LD ₅₀ , КОЕ/мл	к/к проба, дни	
				твин 20	твин 60	твин 80	без угля	с углем									
VIMVR062	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	6,3×10 ⁶	+	(10)
VIMVR063	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	1,0×10 ⁴	+	
VIMVR081	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR082	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	1,58×10 ⁷	+	(11)
VIMVR083	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR084	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR085	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	6,3×10 ⁶	—	
VIMVR086	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR087	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	3,98×10 ⁵	+	(9)
VIMVR088	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR089	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	1,58×10 ⁷	но	
VIMVR090	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	6,3×10 ⁶	но	
VIMVR091	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR092	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	2,51×10 ⁴	но	
VIMVR093	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR094	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR095	+	+	—	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR096	+	+	—	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	
VIMVR097	+	+	+	+	+	+	—	+	β	+	+	+	+	—	но	но	

Примечание: к/к — кератоконъюнктивная проба; но — не определяли.

вирулентность с определением LD₅₀ в биопробах на неинбредных белых мышах и проводилась кератоконъюнктивная проба на морских свинках (табл. 2). Отмечено, что исследуемые штаммы *L. monocytogenes* обладали довольно высокой вирулентностью по отношению к белым мышам, вызывая их гибель или развитие параличей. У морских свинок при инфицировании конъюнктивы глаз наблюдалось развитие гнойного кератоконъюнктивита или кератита.

Таким образом, в группе животных, отловленных в естественных биотопах, по числу инфицированных доминировала полевая мышь (*Apodemus agrarius*), обитающая на равнинной территории Приморского края, от которой чаще всего выделялся патогенный для человека и животных вид *L. monocytogenes*.

Результаты, полученные при изучении биологических свойств и молекулярно-генетических особенностей штаммов *L. monocytogenes*, показывают, что наличие или отсутствие факторов адгезии и инвазии является необходимым условием для персистирования этих бактерий внутри организма диких грызунов. В то же время результаты исследований предполагают существование постоянного эпизоотического процесса листериоза в популяции грызунов, которые при определенных условиях могут явиться источником инфекции. Поэтому с целью мониторинга за листериями необходимы дальнейшие наблюдения, направленные на обследование природных очагов

в разные фазы популяционной численности грызунов — носителей патогенных микроорганизмов.

Литература

1. Боровская Н.А. Иммунологическая характеристика природных и антропогенных очагов лептоспироза на территории Приморского края в современный период : дис. ... канд. мед. наук. — Владивосток, 2002.
2. Джупина С.И., Фомин В.М. // Науч.-производств. конф. «Медико-ветеринарные аспекты листериоза». — Покров, 1993. — С. 15–16.
3. Домарадский И.В. // Журн. микробиол. — 1997. — № 4. — С. 31–35.
4. Зайцева Е.А., Ермолаева С.А., Сомов Г.П. // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. — 2006. — № 4. — С. 42–45.
5. Зайцева Е.А., Сомов Г.П. // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. — 2006. — № 2. — С. 3–6.
6. Зайцева Е.А., Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С. и др. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 81–89.
7. Котляров В.М. // Листериоз на рубеже тысячелетий : мат. симп. — Покров, 1999. — С. 48–52.
8. Маненкова Г.М., Цвиль Л.А. // Мед.-ветеринарн. асп. листериоза : мат. конф. — Покров, 1993. — С. 19–20.
9. Слонова Р.А., Астахова Т.И., Компанец Г.Г. // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. — 1997. — № 5. — С. 97–101.

10. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н. Псевдотуберкулез. — М.: Медицина, 1990.
11. Юзвик Л.Н., Агапов В.А., Ежинов И.П. // Науч.-производств. конф. «Медико-ветеринарные аспекты листериоза». — Покров, 1993. — С. 23–25.
12. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. — М.: Медицина, 2002.
13. Farber J.M., Peterkin P.I. // Microbiol. Rev. — 1991. — Vol. 55, No. 3. — P. 476–511.
14. Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P. et al. // Clin. Microbiol. Rev. — 2001. — Vol. 14. — P. 584–640.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

DISTRIBUTION OF THE LISTERIA MONOCYTOGENES IN MICE IN TERRITORY OF PRIMORSKI KRAI

E.A. Zajtseva¹, S.A. Ermolaeva², G.P. Somov¹

¹ Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok), ² Scientific research institute of epidemiology and microbiology named by N.F. Gamalei, RAMS (Moscow)

Summary — Distribution of bacteria *Listeria* among mice rodents caught in territory of Primorsky Krai is investigated, and separate factors of pathogenicity of the activator, necessary infections at the certain stages and resulting in persisting it in an organism of rodents are revealed. It is marked, that among the surveyed rodents *Listeria* have been found out in the field mouse, it is East-Asian mice, red mice. Over the group of animals on a parameter of *Listeria* infection was dominated with the field mouse (*Apodemus agrarius*), living on flat territory of Primorsky Krai and among it — *L. monocytogenes* which is pathogenic for the human and animals was allocated. Researches have shown existence of epizootic process of *Listeria* in a population of mice rodents in territory of Primorsky Krai which under certain conditions can be a source of an infection.

Key words: *Listeria*, rodents, factors of pathogenicity, internalin.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 65–69.

УДК 616.61-008.6-085:[616.98:578.833.29

Ю.Г. Образцов¹, А.Ф. Попов², В.А. Иванис², Т.В. Кушнарева³

¹ Военно-морской клинический госпиталь ТОФ (г. Владивосток), ² Владивостокский государственный медицинский университет, ³ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

ЭТИОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, рибавирин, лечение.

У 20 больных с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом применена ступенчатая методика терапии виразолом (внутривенное введение 16 мг/кг 4 раза в сутки) в течение 3 дней с последующим приемом верорибавирина внутрь (1000 мг в сутки — 5 дней). Начало терапии у всех больных приходилось на 4–5-й дни болезни. У пациентов, получавших виразол, быстрее нормализовалась температура тела, исчезали боли в животе и области поясницы, меньше была продолжительность олигурии, отсутствовал геморрагический синдром. Продолжительность обнаружения РНК хантавируса в крови 20 пациентов, получавших виразол и рибавирин, была меньше, чем у пациентов, не получавших противовирусные препараты. Установлено положительное влияние виразола на иммунопатогенез инфекции, что подтверждено данными уровня цитокинов.

В последние годы все большее признание завоевывает этиотропная терапия вирусных инфекций. Известный противовирусный препарат рибавирин, обладающий широким спектром активности против РНК- и ДНК-содержащих вирусов, используется в терапии острых и хронических рецидивирующих инфекций. Опыт применения рибавирина и его аналогов (виразол, рибамидил) у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС), ассоциированной с серотипами Хантаан в Китае (1991–1994), Пуумала — в России (1991, 1993, 2000), и хантавирусным легочным синдромом, вызванным вирусом Син Номбре в США (1994), показал его эффективность в ранние сроки болезни. Высокую оценку получило рандомизированное плацебоконтролируемое лечение ГЛПС рибавирином в Китае в 1988–1994 гг., когда впервые было установлено быстрое снижение

вирусной нагрузки у 242 больных. Главным показателем эффективности в этом исследовании было статистически значимое снижение летальности (в 7 раз по сравнению с плацебо). Изучена клиническая эффективность препарата: на фоне приема рибавирина отмечалось уменьшение продолжительности лихорадки, олигурии, снижение риска развития геморрагического синдрома. Авторы показали более высокую эффективность при парентеральном введении рибавирина. J.W. Huggins et al. (1988), Y. Zhang et al. (1992), Z.O. Yang et al. (1992), участвуя в этой серии клинических испытаний, проанализировали динамику виремии методами изоляции вируса и определения иммуноглобулин М в непрямом методе флуоресцирующих антител и ELISA [4, 6, 7]. Терапевтический эффект рибавирина заключался в быстром прерывании репликации хантавируса при достижении нагрузочной дозы препарата (33 мг/кг). Подтверждение противовирусной эффективности рибавирина нашло отражение и в результатах недавних исследований W. Severson et al. [5], изучавших механизмы прекращения репликации хантавируса.

В отечественной клинической практике этиотропная терапия ГЛПС не укрепились, учитывая неэффективность противовирусных препаратов в более поздние сроки болезни, когда госпитализируется большая часть пациентов с тяжелыми формами инфекции и ее исход определяет не вирусная нагрузка, а полиорганная недостаточность и неотложные состояния. Отрицательное отношение к этиотропной терапии подкреплялось мнением о коротком периоде виремии

при ГЛПС, трудностью дозирования рибавирина, невозможностью приема препарата внутрь у больных с тяжелым течением инфекции. В последнее десятилетие разработка методов генной диагностики позволила констатировать индикацию РНК хантавируса более продолжительное время (до 15–18-го дня болезни), что диктует необходимость применения противовирусных средств в период разгара болезни [1, 2, 3].

Целью настоящего исследования явился анализ эффективности рибавирина в лечении больных ГЛПС.

В наших исследованиях применена инфузионная форма рибавирина – виразол (ICN Pharmaceuticals, Швейцария) у 20 больных с тяжелой формой ГЛПС, ассоциированной с серотипами Хантаан (16 чел.) и Сеул (4 чел.), а также пероральная форма – вероривавирин (ЗАО «Верофарм», Россия).

Использовалась ступенчатая методика лечения виразолом (внутривенное введение 16 мг/кг 4 раза в сутки в течение 3 дней с последующим приемом вероривавирина внутрь 1000 мг в сутки – 5 дней). Начало лечения у всех больных приходилось на 4–5-й день болезни. Эффективность лечения оценивали при сравнении динамики клинических синдромов ГЛПС, качественной индикации РНК хантавируса и иммунологических тестов в группе из 20 больных. Контролем послужили 20 пациентов, сопоставимых по возрасту, полу и тяжести ГЛПС, в комплекс традиционной патогенетической терапии которых не были включены препараты рибавирина.

Определение цитокинов в сыворотке крови: фактора некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкинов (IL) 8 и 10, γ -интерферона (IFN- γ) проводили с использованием специфических реактивов фирмы R&D. Diagnostics Inc. (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа согласно прилагаемой инструкции. Учет результатов выполняли с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Содержание цитокинов в сыворотке крови исследовалось двукратно – в раннюю и позднюю стадии заболевания – с интервалом в 7–10 дней. Расчеты количества цитокинов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пикограммах на миллилитр (пг/мл). Чувствительность применяемых реактивов составляла 1 пкг/мл.

При анализе клинических проявлений у пациентов, получавших виразол, отмечена достоверная позитивная динамика болезни. Гораздо быстрее нормализовалась температура тела, период лихорадки составил $3,3 \pm 1,8$ дня (в контрольной группе – $5,6 \pm 1,9$). Уменьшилась по сравнению с контролем и продолжительность некоторых ведущих симптомов: головной боли ($5,3 \pm 0,4$ против $7,9 \pm 0,2$ дня), рвоты ($3,3 \pm 1,2$ против $7,1 \pm 0,5$ дня). Быстрее исчезали боли в животе и области поясницы ($3,5 \pm 1,1$ против $5,5 \pm 1,0$ дня). Характерным было отсутствие прогрессирования геморрагического синдрома и угрожающих массивных кровотечений. Очевидной оказалась и динамика острой почечной

недостаточности. Так, в опытной группе не зарегистрирована анурия, меньше была продолжительность олигурии ($1,8 \pm 0,4$ против $3,4 \pm 0,6$ дня). Картина ультразвукового исследования почек через неделю после начала терапии показала более ускоренные темпы уменьшения отека паренхимы почек у пролеченных виразолом пациентов ($1,2 \pm 0,1$ и $0,5 \pm 0,3$ см), причем ни в одном случае не потребовался гемодиализ. Несмотря на почти одинаковую продолжительность нарастания азотемии, максимальные уровни мочевины и креатинина сыворотки крови были достоверно ниже у больных опытной группы (уровень мочевины – $16,5 \pm 1,2$ против $21,2 \pm 1,05$ ммоль/л в контроле). Характерно, что с началом терапии виразолом увеличение уровня креатинина (в отличие от мочевины) не наблюдалось ни у одного больного. Достоверные различия в величине показателей зарегистрированы в отношении аланиновой трансаминазы, характеризующей цитолитические процессы в печени ($40,8 \pm 1,2$ против $48,0 \pm 2,1$ ммоль/л в контроле). Уровень же аспаратаминотрансферазы не зависел от варианта лечения и был сходен в обеих группах пациентов. Данные гемостезиограммы, в том числе и по количеству тромбоцитов, существенных различий в показателях двух групп не выявили.

Продолжительность обнаружения РНК хантавируса у 20 пациентов, получавших виразол и рибавирин, была меньше, чем у пациентов без включения в комплекс терапии противовирусных средств. Так, на фоне парентерального введения виразола через 1–2 дня РНК вируса обнаруживалась у 12 из 20 больных (62%) в отличие от контрольной группы, в которой РНК выявлялась в 85% наблюдений – у 17 из 20 больных. В среднем РНК в опытной группе обнаруживалась до 4–5-го дня болезни, в контрольной группе до 8–9-го дня (табл. 1).

Наиболее впечатляющие доказательства влияния виразола на иммунопатогенез ГЛПС получены при исследовании уровня цитокинов, от профиля которых зависит тип иммунного ответа и, следовательно, функции активируемых эффекторных клеток (табл. 2). Уровни провоспалительных TNF- α и IFN- γ в обеих группах исходно (на 5–7-й дни болезни) отличались противоположными значениями. Так, уровень TNF- α превысил показатели нормы в 15 раз, предполагая процессы цитотоксичности, прокоагулянтности и активизации эндотелиальных клеток к адгезии. Содержание IFN- γ , главного активатора макрофагов, напротив, было снижено в 7 раз, что показывает преобладание преимущественно гуморального типа иммунного ответа.

Через 8 дней лечения данные показатели значительно отличались в опытной и контрольной группах. Так, уровень TNF- α на фоне этиотропной терапии снизился вдвое, а в контрольной сохранялся высоким. Это подтверждает значение вирусного фактора в патогенезе системных сосудистых эффектов TNF- α : повышения проницаемости клеточных мембран и цитотоксичности к инфицированному сосудистому эндотелию. Динамика IL-10 также была позитивной в опытной группе

Таблица 1

Обнаружение РНК хантавируса у больных ГЛПС с учетом противовирусной терапии

Сроки обнаружения РНК хантавируса, дни	Кол-во больных, абс.	
	опыт	контроль
Исходно	20	20
После 1–2	12	17
После 3–4	3	12
После 5–6	2	11
После 7–10	0	6
После 11–14	0	2
После 15–18	0	0
После 19–20	0	0

Таблица 2

Уровень цитокинов в сыворотке крови больных ГЛПС при противовирусной терапии ($M \pm m$), пг/мл

Цитокин	Норма	До лечения (обе группы)	После лечения	
			опыт	контроль
TNF- α	4,2 $\pm$ 1,2	61,5 $\pm$ 0,84 ¹	31,8 $\pm$ 2,9 ^{1,2}	48,1 $\pm$ 4,9 ^{1,2,3}
IFN- γ	14,3 $\pm$ 1,7	2,01 $\pm$ 0,50 ¹	3,1 $\pm$ 0,4 ¹	2,9 $\pm$ 0,2 ¹
IL-10	13,9 $\pm$ 0,7	118,6 $\pm$ 4,40 ¹	83,9 $\pm$ 0,91 ^{1,2}	105,6 $\pm$ 0,85 ^{1,2,3}
IL-10/IFN- γ	0,9 $\pm$ 0,01	59,0 $\pm$ 0,03 ¹	27,06 $\pm$ 0,9 ^{1,2}	36,4 $\pm$ 0,5 ^{1,2,3}

¹ Разница по сравнению с нормой статистически значима.

² Разница до и после лечения статистически значима.

³ Разница с опытом после лечения статистически значима.

пациентов, где уровень цитокина после лечения снизился достоверно больше, чем в контроле.

Динамика очень низких уровней IFN- γ , напротив, в обеих группах наблюдения статистически не различалась, что свидетельствует о сохранении нарушений клеточного звена иммунного ответа на фоне этиотропной терапии, что, вероятно, связано со снижением функциональной активности Т-лимфоцитов – продуцентов IFN- γ . Иммунорегуляторный коэффициент IL-10/IFN- γ , благодаря усилению продукции IL-10, после лечения у больных опытной группы оказался вдвое ниже исходных значений в отличие от контрольной группы. Это демонстрирует реальный дефицит IFN- γ , несмотря на проведенное этиотропное лечение (табл. 2).

Таким образом, зарегистрирована эффективность вирусаза при тяжелом течении ГЛПС как по клиническим (уменьшение выраженности токсикоза и почечной недостаточности), так и вирусологическим (быстрое снижение виремии) показателям. Установлено также положительное влияние препарата на иммунологические показатели. Больные с легкими формами ГЛПС независимо от этиологического агента не нуждаются в противовирусной терапии, что согласуется с отсутствием выраженных изменений в клинико-лабораторных показателях и иммунном ответе. Больным со среднетяжелыми формами Сеул-инфекции также не показана противовирусная тера-

пия. В отношении больных с тяжелой формой Сеул-инфекции подход к противовирусной терапии должен быть индивидуальным, с учетом преморбидного фона и фазы течения. Пациенты со среднетяжелыми формами ГЛПС, ассоциированной с вирусом Хантаан, в ранней фазе заболевания нуждаются в противовирусной терапии при наличии критериев прогноза тяжелого течения и, безусловно, всем больным с тяжелыми формами болезни показана противовирусная терапия [1].

Литература

1. Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника, иммунокорригирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом в регионе циркуляции разных серотипов хантавирусов : дис. ... д-ра мед. наук. – Владивосток, 2004.
2. Образцов Ю.Г. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом у военнослужащих в Приморском крае (клинико-эпидемиологическая характеристика и возможность этиотропной терапии) : дис. ... канд. мед. наук. – Санкт-Петербург, 2005.
3. Слонова Р.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом на юге Дальнего Востока России (вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты) : дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1993.
4. Huggins J.W., Kim G.R., Brand O.M. // *Proceedings of Int. Symp. on Hemorrhagic Fever with renal syndrome. – Hubei (China), 1988. – P. 74.*
5. Severson W.E., Schmaljohn C.S., Javadian A. et al. // *J. Virol. – 2003. – Vol. 77, No. 1. – P. 481–488.*
6. Yang W., Bai X., Zhang W. // *2nd Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome : abstracts. – Beijing (China), 1992. – P. 48.*
7. Zhang T.M., Huggins J.W., Jang Z.Q., et al. // *2nd Int. Conf. on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome : abstracts. – Beijing (China), 1992. – P. 157.*

Поступила в редакцию 14.05.2008.

ETHIOLOGIC THERAPY OF THE HEMORRHAGIC FEVER WITH NEPHRITIC SYNDROME

Yu.G. Obratsov¹, A.F. Popov², V.A. Ivanis², T.V. Kushnareva³

¹ Pacific Navy Hospital (Vladivostok), ² Vladivostok state medical university, ³ Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok)

Summary – At 20 patients with the hemorrhagic fever with nephritic syndrome the step technique of virazol therapy (intravenous introduction of 16 mg/ kg 4 times day) within 3 days with the subsequent veroribavirin per os of (1000 mg day – 5 days) is applied. The beginning of therapy at all patients was in 4th-5th day of illness. At the patients receiving virazol, the body temperature was faster normalized, stomach pain disappeared, there was less oliguria duration, hemorrhagic syndrome was absent. Duration of RNA detection of hantavirus infection in blood of 20 patients receiving virazol and ribavirin, was less, than at patients not receiving antiviral medications. Positive influence of virazol on immuno-pathogenesis of the infections that is confirmed with the data of a cytokine level is found.

Key words: the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, ribavirin, treatment.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-092(571.6)

Л.М. Сомова¹, Р.А. Слонова¹, В.А. Фигурнов², Н.А. Марунич², Н.Г. Плехова¹, А.В. Гаврилов², Е.И. Дробот¹,
Е.В. Фигурнова²

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток), ² Амурская государственная медицинская академия (г. Благовещенск)

ПАТОМОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ РЕГИОНЕ

Ключевые слова: хантавирус, цитоллиз, микроциркуляция, патоморфогенез.

На основании анализа летальных случаев геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), наблюдавшихся в Приморском крае и Амурской области, определены особенности патологического процесса при этой инфекции в Дальневосточном регионе. Показано, что основной патогенетической сущностью ГЛПС является системное поражение сосудов микроциркуляторного русла, обусловленное вазотропностью и выраженными токсическими свойствами хантавируса в период вирусемии. При этом хантавирус оказывает прямое цитолитическое действие на эндотелиальные клетки. Отмечено, что деструктивно-некротические изменения в органах-мишенях (особенно в почках и легких) носят не только вторичный характер вследствие выраженных гемодинамических расстройств, но также связаны с прямым действием вируса. Особенностью патоморфологии ГЛПС является минимальная выраженность свойственной типичному воспалению клеточной реакции в тканях, что обусловлено развивающимся при этой инфекции дисбалансом провоспалительных цитокинов.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) как основная форма проявления хантавирусной инфекции в Российской Федерации остается стабильно значимой в инфекционной патологии дальневосточного региона. За последнее десятилетие в Приморском крае тяжелые и осложненные формы ГЛПС в 31,1% случаев были связаны с вирусами *Hantaan* (геновариант *Far East*) и *Amur*, при которых показатель летальности колебался от 1,2 до 7,8% [1]. В 76,2% случаев летальные исходы заболеваний, ассоциированных с этими хантавирусами, наступали в период кульминации инфекционного процесса — на 8–12-й день болезни [5]. Как отмечают авторы, непосредственными причинами смерти явились синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), профузные желудочно-кишечные кровотечения, острая почечная недостаточность и уремия, острый респираторный дистресс-синдром и/или пневмония.

Хотя патоморфологическая картина, свойственная дальневосточному варианту ГЛПС, детально охарактеризована [6], остается целый ряд недостаточно осмысленных аспектов патологического процесса, понимание которых чрезвычайно важно для диагностики и усовершенствования патогенетической терапии этой болезни. В первую очередь это касается механизма системного поражения сосудов микроциркуляторного русла, что лежит в основе развития характерной органопатологии при ГЛПС. По мнению Т.А. Башкирева и Ю.С. Забусовой (1980), первичным звеном патоморфогенеза ГЛПС является

генерализованный иммунокомплексный васкулит, протекающий с признаками гиперчувствительности немедленного типа, который приводит к резкому повышению проницаемости сосудов и развитию серозно-геморрагического воспаления в тканях и органах [6]. Эта точка зрения имеет наибольшее число сторонников, при этом иммунопатологические механизмы рассматриваются как следствие вазотропного действия вируса в тесной связи с патогенным действием иммунных комплексов.

Полученные в последние годы данные по иммунопатогенезу ГЛПС [1] и хантавирусного легочного синдрома, вызываемого вирусом *Sin Nombre* и регистрируемого в США, свидетельствуют о развитии цитокиноопосредованных повреждений при хантавирусной инфекции [8, 12, 14].

Нами проанализирован аутопсийный материал от 12 больных ГЛПС в возрасте от 21 до 51 года, погибших в Приморском крае и Амурской области. Во всех случаях смерть наступила в олигоанурический период (7–12-е сутки болезни) с выраженными органными поражениями. В клинической картине отмечались геморрагический и легочный синдромы с явлениями геморрагической пневмонии и желудочно-кишечными кровотечениями, острая почечная недостаточность. Вариант течения заболевания у большинства больных был расценен как инфекционно-токсический шок и ДВС-синдром. Гистологическая обработка материала проведена по общепринятым методикам с заливкой в парафин и окраской срезов гематоксилином и эозином, а также выборочно — по Шуенинову на фибрин.

Обобщенный анализ полученных результатов свидетельствовал во всех случаях о типичной патоморфологической картине с наличием резких изменений со стороны сосудов микроциркуляторного русла и деструктивно-некротических изменений с вовлечением почек, легких, гипофиза, сердца, печени. Не детализируя патологический процесс в целом, мы сочли целесообразным остановиться на некоторых патоморфогенетических особенностях ГЛПС, которые носят дискуссионный характер и недостаточно полно освещены в литературе.

В настоящее время не вызывает сомнения, что основной патогенетической сущностью ГЛПС, как и хантавирусных инфекций вообще, является поражение сосудистой стенки, обусловленное вазотропностью и выраженными токсическими свойствами

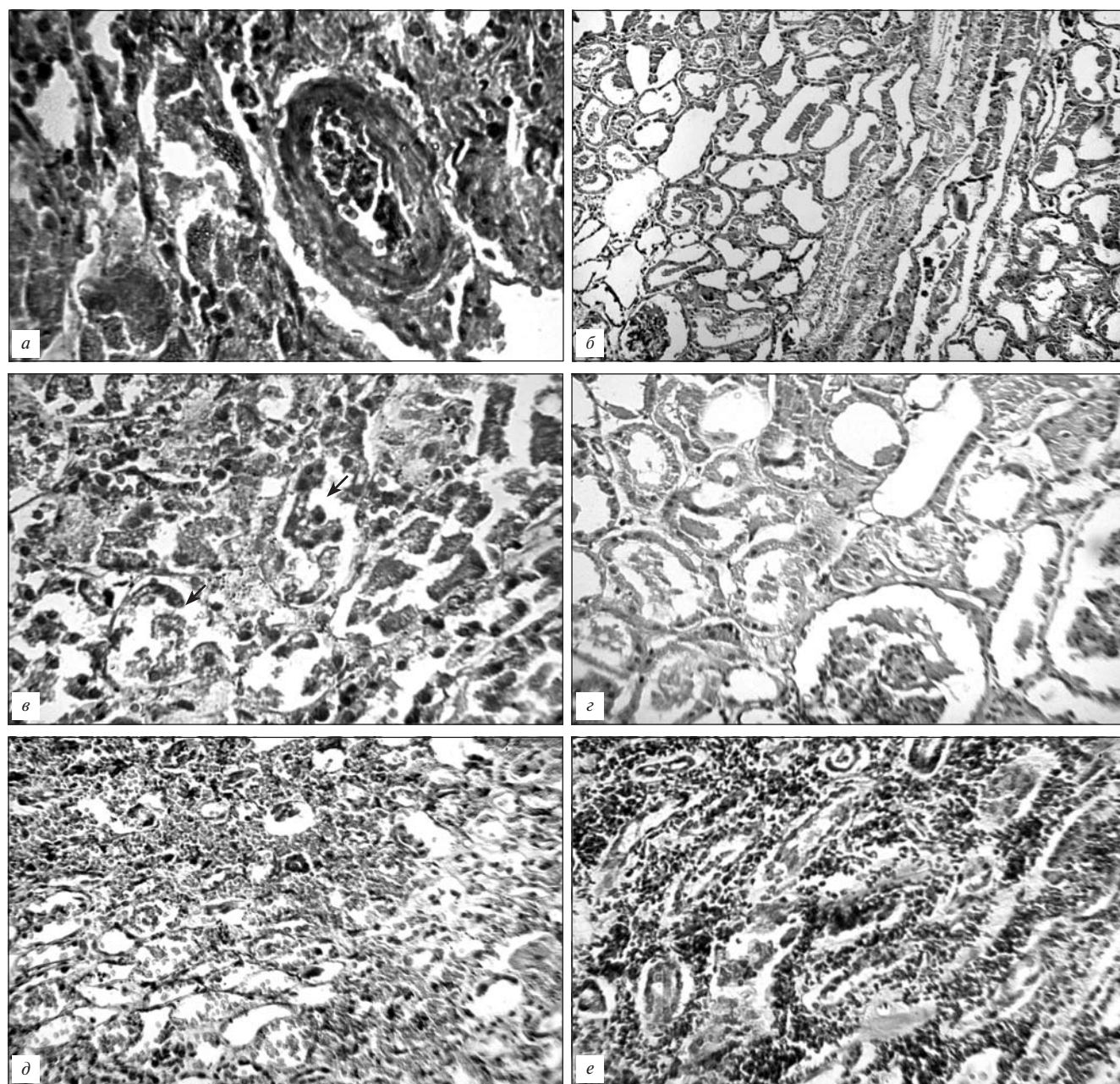


Рис. 1. Патогистологические изменения в почках больных ГЛПС, умерших в олигоанурической фазе болезни.

а — эритростаз, десквамация эндотелия и фибриноидное набухание стенки венулы в корковом слое; *б* — внутрисосудистая агрегация крови, некротические изменения эпителия извитых канальцев; *в* — редукция капилляров клубочкового аппарата (стрелка); *г* — некроз эпителия извитых канальцев с наличием клеточного детрита и цилиндров в их просвете; *д* — обширное кровоизлияние в мозговом слое; *е* — имbibция кровью и некроз почечных пирамид. Окраска гематоксилином и эозином; *а, д, е* — $\times 200$, *б* — $\times 100$, *в, г* — $\times 400$.

хантавируса, быстрым развитием вирусемии. В этой связи вызывают сомнение высказывания ряда авторов [10, 13, 15] об отсутствии при хантавирусном легочном синдроме цитопатического действия вируса на эндотелиальные клетки при его сильном тропизме к ним. Наличие такого действия подтверждается результатами наших исследований, показавших распространенный цитоллиз эндотелиального слоя микрососудов, особенно посткапиллярных венул и капилляров, начиная с первых дней болезни (рис. 1, а, б; 2, в, г). На прямой повреждающий эффект хантавируса на микрососуды указывает, по всей вероятности, и факт появления так называемых редуцированных капил-

ляров («культы сосудов») у больных ГЛПС, выявленный при помощи фотобиометрии конъюнктивы [4], а также в наших наблюдениях при заполнении сосудов почки контрастной массой.

Согласуется с вышеуказанным вопрос о взаимодействии хантавируса с клетками моноцитарного происхождения. Как установлено нами ранее [3], моноциты/макрофаги являются одной из клеток-мишеней для хантавируса, в которых происходит его размножение. При этом в макрофагах развивается острая литическая форма продуктивной инфекции, когда в процессе репродукции полноценного вируса происходит накопление структурных вирусных

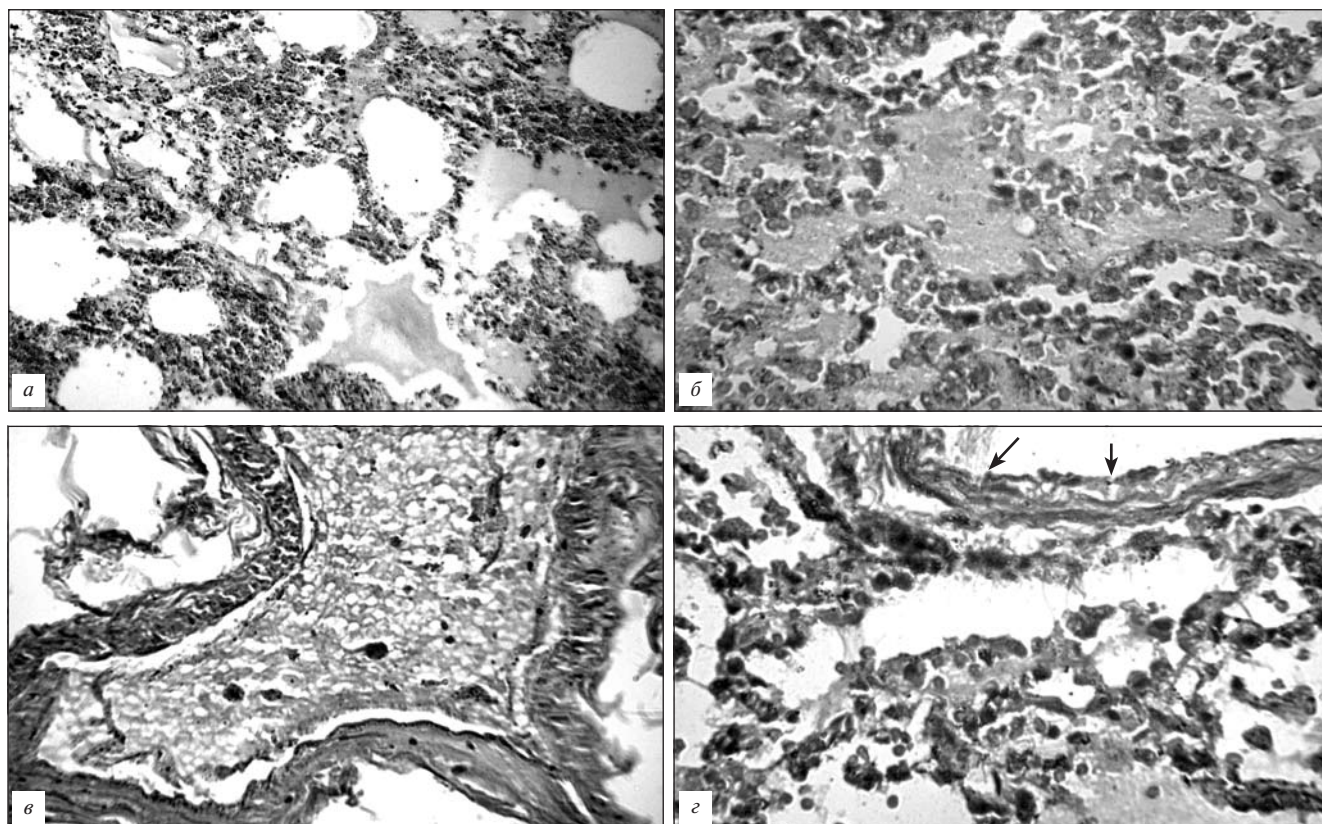


Рис. 2. Патогистологические изменения в легких больных ГЛПС, умерших в олигоанурической фазе болезни.

а — картина серозно-геморрагического отека; б — obturation просвета альвеол эозинофильными массами с примесью слущенных эпителиоцитов; в — сосуд венозного типа с набуханием и плазматическим пропитыванием стенки, десквамация эндотелиального пласта, в просвете фибрин и единичные мононуклеарные клетки; г — деструкция стенки венулы (стрелка), повреждение альвеол, содержащих в просвете слущенные клетки и белковый материал. Окраска гематоксилином и эозином; а — $\times 100$, б — $\times 200$, в, г — $\times 400$.

компонентов, оказывающих токсическое и механическое повреждение непосредственно на макрофаги. В такой ситуации при инфицировании организма можно достаточно определенно считать, что хантавирус оказывает прямое цитопатическое влияние на эндотелиальные клетки, с которыми взаимодействует циркулирующий пул клеток периферической крови.

Деструктивно-некротические изменения клеток органов и тканей, наиболее выраженные в почках и легких, традиционно расценивают как повреждения вторичного характера, обусловленные системным нарушением микроциркуляции. Наряду с этим мы считаем, что некротический компонент патологического процесса при ГЛПС также (а скорее всего, в первую очередь) связан с прямым цитолитическим действием вируса на клетки паренхиматозных органов. Это убедительно демонстрируют патогистологические изменения, обнаруженные в наших наблюдениях (рис. 1). Обращает на себя внимание чрезвычайно распространенный цитолитический эффект вируса на клетки канальцевого аппарата почек на всех уровнях нефрона в пределах как коркового, так и мозгового слоев, в которых имеют место дифференцированные нарушения микроциркуляции (обескровливание коркового и резкое полнокровие мозгового слоя). Во всех случаях, наряду с повреждением канальцев, выявлялось повреждение сосудистых клубочков разной

степени тяжести (рис. 1, в, г). Подтверждением прямого участия вируса Хантаан в поражении почек являются электронно-микроскопические исследования Т. Ханга (1991), который с помощью иммуноколлоидного золота обнаружил в почках больных, умерших от ГЛПС в олигурической фазе заболевания, типичные хантавирусные вирионы и большое количество преципитатов специфического комплекса «антиген — антитело» [7]. В наших наблюдениях, наряду с почками, постоянно наблюдались изменения в легких, проявлявшиеся в виде серозно-геморрагического отека, деструкции сосудов микроциркуляторного русла и кровоизлияний, а также участков ателектаза и некротических изменений альвеолярного эпителия, что напоминало картину «шокового легкого» (рис. 2).

В генезе некротических изменений эндотелия сосудов и клеток паренхиматозных органов наряду с цитолитическим действием самого хантавируса, по всей вероятности, немаловажное значение имеет гиперпродукция провоспалительных цитокинов, в первую очередь тумор-некротического фактора- α , способного оказывать цитотоксическое действие на клетки-мишени. Исследованиями последних лет установлено значительное (в 6 раз) повышение уровня этого цитокина у больных ГЛПС начиная с ранних сроков болезни [1], и с высокой его активностью связывают «капиллярную протечку» (capillary leakage) [11, 14].

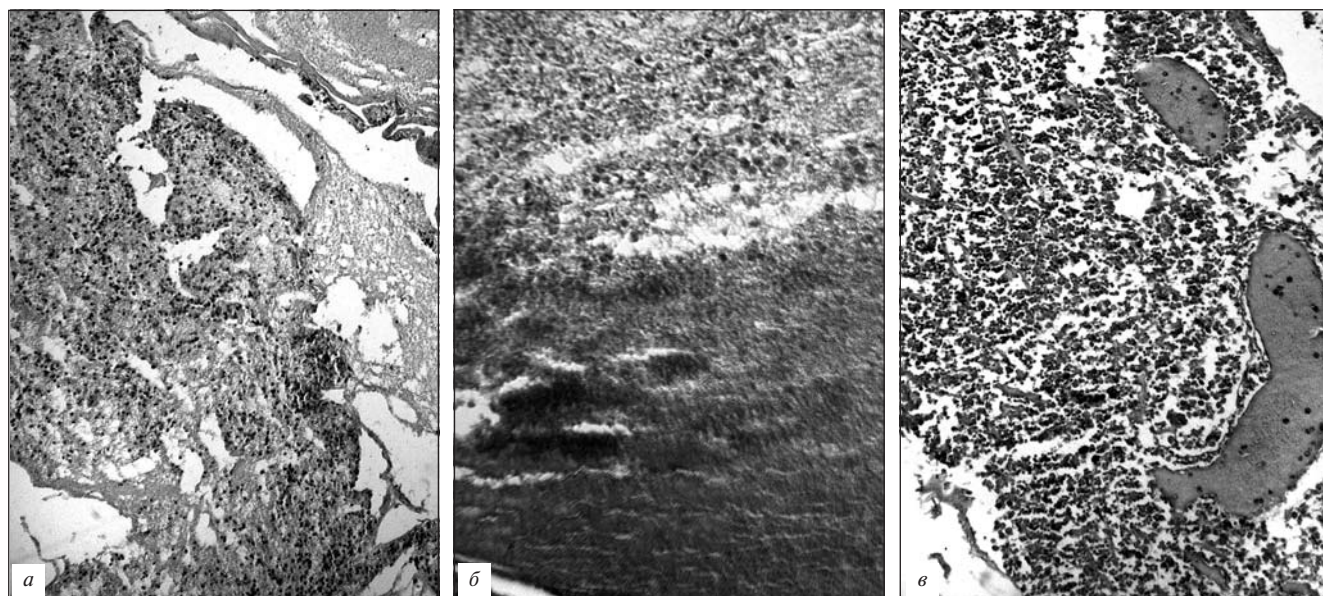


Рис. 3. Патогистологические проявления ДВС-синдрома при ГЛПС.

а — сгусток крови из полости сердца, состоящий из эритроцитов, фибрина, тромбоцитов и большого количества лейкоцитов; *б* — тромботическая масса из сердца с положительной окраской на фибрин; *в* — гиалиновые тромбы в просвете расширенных венул селезенки. Окраска гематоксилином и эозином (*а*, *в*) и по Шуенинову (*б*); *а* — $\times 100$, *б*, *в* — $\times 200$.

Своеобразие патоморфологической картины ГЛПС составляет скудность воспалительных изменений в стенке кровеносных сосудов и паренхиме внутренних органов, на что обращал внимание еще А.Г. Кестнер (1960), сказав, что при этом заболевании «нет ни нефроза, ни нефрита» [4]. Эта же особенность отмечена в случаях ГЛПС, наблюдавшихся в Хабаровском крае [4]. Как указано нами ранее [6], отсутствие заметной клеточной инфильтрации непосредственно связано с супрессией гиперергических реакций замедленного типа в структуре воспалительного процесса и развивающимся при этом заболевании дисбалансом цитокинового статуса. Последнее проявляется в резком снижении продукции γ -интерферона на фоне экспрессии другого провоспалительного цитокина — интерлейкина-1, что ингибирует пролиферативную способность макрофагов и лимфоцитов [1]. Эта особенность отличает дальневосточный вариант ГЛПС от хантавирусного легочного синдрома, описанного в США, при котором в большинстве летальных случаев на фоне гемоциркуляторных нарушений отмечается картина интерстициальной пневмонии [9, 15].

В заключение считаем целесообразным обратить внимание исследователей на необходимость анализа механизмов развития инфекционно-токсического шока при ГЛПС, который часто отмечают клиницисты, характеризуя ДВС-синдром. В наших случаях его проявления выражались в виде распространенных геморрагических повреждений в органах и образования микротромбов (рис. 1–3). Следует отметить, что до последнего времени инфекционно-токсический (или септический) шок, включая ДВС-синдром, по-прежнему ассоциируется преимущественно с тяжело протекающими бактериальными инфекциями [2].

Литература

1. Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника, иммунокорректирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом в регионе циркуляции разных серотипов хантавируса : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Владивосток, 2004.
2. Пальцев М.А., Аничков Н.М. Патологическая анатомия : учебник. — М. : Медицина, 2001.
3. Плехова Н.Г., Сомова-Исачкова Л.М., Слонова Р.А. и др. // Цитология. — 2003. — Т. 45, № 8. — С. 770–779.
4. Сиротин Б.З. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. — Хабаровск, 1994.
5. Слонова Р.А., Ткаченко Е.А., Иванис В.А. и др. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2006.
6. Сомова-Исачкова Л.М., Плехова Н.Г., Компанец Г.Г. и др. // Хантавирусы и хантавирусные инфекции. — Владивосток, 2003. — С. 182–200.
7. Ханг Т. // Междунар. симп. по геморрагической лихорадке с почечным синдромом : тез. докл. — Ленинград, 1991. — С. 14.
8. Colby T.V., Zaki S.R., Feddersen R.M. et al. // Arch. Path. Lab. Med. — 2000. — Vol. 124, No. 10. — P. 1463–1466.
9. Kanerva M., Mustonen J., Vaheri A. // Rev. Med. Virol. — 1998. — Vol. 8. — P. 67–86.
10. Kraukauer T., Leduc J.W., Kraukauer H. // Viral. Immunol. — 1995. — Vol. 8, is. 2. — P. 75–79.
11. Markotic A. // Acta Med. Croatica. — 2003. — Vol. 57, No. 5. — P. 407–414.
12. Pensiero M.N., Sharefkin J.B., Dieffenbach C.W., Hay J. // J. Virol. — 1992. — Vol. 66. — P. 5929–5936.
13. Terajima M., Hayasaka D., Maeda K., Ennis F. // Immunol. Lett. — 2007. — Vol. 113, No. 2. — P. 117–120.
14. Yanagihara R., Silverman D.J. // Arch. Virol. — 1990. — Vol. 111. — P. 281–286.

15. Zaki S.R., Greer P.W., Coffield L.M. et al. // *Amer. J. Path.* — 1995. — Vol. 146. — P. 552–579.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

PATHOMORPHOGENETIC FEATURES OF THE HEMORRHAGIC FEVER WITH NEPHRITIC SYNDROME IN FAR EAST REGION

L.M. Somova¹, R.A. Slonova¹, V.A. Figurnov², N.A. Marunich², N.G. Plehova¹, A.V. Gavrilov², E.I. Drobot¹, E.V. Figurnova²

¹ Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok), ² Amur state medical academy (Blagoveshchensk) Summary — On the basis of the analysis of lethal cases the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, observed in Primorsky Krai and the Amur area, are determined features of pathological process at this infection in Far East region. It is shown, that

basic pathogenetic path of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome is system defeat of micro vessels, caused by expressed toxic properties of hantavirus during the period of viremia. Thus hantavirus infection renders direct cytolytic action on endothelial cells. It is marked, that the destructive necrotic changes in target organs (especially in kidneys and lungs) carry not only secondary character owing to expressed hemodynamic frustration, but also are connected to direct action of a virus. The specific features of patho-morphology of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome is the minimal expressiveness of cellular reaction peculiar to a typical inflammation in tissue that is caused by misbalance of inflammatory cytokines developing at this infection.

Key words: hantavirus infection, cytolysis, microcirculation, patho-morphogenesis.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 71–76.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-036.17-092

В.А. Фигурнов, Н.А. Марунич, А.В. Гаврилов, Е.В. Фигурнова

Амурская государственная медицинская академия (г. Благовещенск)

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ И НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПАТОГЕНЕЗА ПРИ ТЯЖЕЛОМ ТЕЧЕНИИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, почки, легкое, сердце.

Представлен анализ клинического течения и исходов при тяжелом течении геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). Выявлены некоторые закономерности патогенеза болезни, а также общие особенности в поражении почек, сердца и легких. Проанализированы макро- и микроскопические изменения основных органов-мишеней, в том числе и на основе посмертного рентгеноконтрастного исследования. Показано, что полиорганная недостаточность при ГЛПС определяется не только поражением микроциркуляторного русла, но и крупных внутриорганных сосудов.

Развитие инфекционного процесса при геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС) имеет сложные механизмы, связанные с непосредственным воздействием вируса на стенки мелких кровеносных сосудов всех органов, что и приводит к развитию геморрагического синдрома, инфекционно-токсического шока, острой почечной недостаточности как ведущих причин неблагоприятного исхода болезни [1–3]. Ранее нами неоднократно сообщалось о преобладании тяжелых форм ГЛПС у больных на территории верхнего Приамурья с нередкими смертельными исходами [4–6]. В настоящем сообщении представлены результаты дальнейшего исследования тяжелых форм ГЛПС на территории области, особенностей течения и причин летальных исходов у умерших, общих закономерностей полиорганной недостаточности и патогенеза болезни.

В основу исследования положены материалы 40-летнего изучения ГЛПС в регионе верхнего Приамурья (400 больных), результаты патолого-анатомических вскрытий и анализа гистологических препаратов (74 умерших), а также специального исследования головного мозга и гипофиза с помощью магнитно-

резонансной томографии. Кроме того, выполнялось посмертное рентгеноконтрастное исследование: сосудистая сеть почек, сердца и легких заполнялась смесью свинцового сурика на желатине в соотношении 8:10 с последующей рентгенографией. Этиология ГЛПС подтверждена с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител с четырехкратной и более сероконверсией в парных сыворотках в разведении от 1:160 до 1:32000.

Клиническое течение тяжелых форм ГЛПС. Данная форма заболевания наблюдалась нами у 76,5% мужчин (возраст 32 ± 2 года) и 23,5% женщин (возраст 42 ± 2 года). У этих больных были более выражены симптомы интоксикации, наблюдались сильные постоянные боли в пояснице, боли в животе, икота, носовые, желудочные и маточные кровотечения, нарушение зрения (потемнение в глазах, темные нечеткие круги перед глазами) в спокойном (лежачем) положении. Именно в этой группе больных, особенно в олигурическом периоде заболевания, появлялись кровоизлияния в склеру, геморрагическая сыпь (сливная, линейная) в подмышечных областях, на груди, боковых поверхностях туловища, голове, спине, руках и бедрах. Возникали обширные кровоизлияния в местах инъекций, давления нательного и постельного белья, после измерения артериального давления. Именно при тяжелом течении ГЛПС мы наблюдали больных с лейкоцитарной реакцией крови (до $132 \times 10^9 / \text{л}$) и массивной протеинурией (до 150 г/л), выделением с мочой кроваво-красных сгустков и анурией.

Особенности поражения почек. Острая почечная недостаточность (ОПН) — один из основных синдромов ГЛПС. Отдельные его симптомы наблюдаются

при всех формах заболевания, но особенно это проявляется при тяжелом течении. Прогностическими признаками развития ОПН являются повышение артериального давления в конце лихорадочного — начале олигурического периода, высокий лейкоцитоз, низкий (менее 1,010) удельный вес мочи, резкое увеличение в осадке мочи количества эритроцитов, понижение в ней концентрации калия, мочевины, креатинина, кальция, магния, хлоридов. Крайне прогностически неблагоприятным является появление кислой реакции мочи ($\text{pH} < 6,0$).

Одним из редко наблюдаемых осложнений ОПН является развитие эклампсии, проявляющейся нарушением сознания, судорогами и высоким артериальным давлением. Подобное осложнение мы наблюдали у 7 больных (девочка 6 лет, мальчик 12 лет и 5 мужчин в возрасте от 21 до 38 лет). Смертельные исходы зарегистрированы у 2 взрослых больных. Вероятным механизмом этого осложнения было глубокое поражение мелких кровеносных сосудов, кровоизлияния в ткань головного мозга. При этом вес сухого остатка ткани головного мозга (кора, подкорковые ядра, белое вещество) и содержание в нем основных электролитов (натрия и калия) не изменялись.

По нашим наблюдениям основными особенностями ОПН при ГЛПС являются сочетание признаков поражения почек с геморрагическим синдромом, непродолжительность олигоанурии и резкое увеличение концентрации калия в крови. Несмотря на повышение артериального давления, со стороны глазного дна какой-либо патологии не отмечалось, и даже при массивном геморрагическом синдроме видимых кровоизлияний на глазном дне не обнаружено.

При патолого-анатомическом исследовании регистрировалось увеличение почек в размерах, орган мог достигать массы 555–650 г. В околопочечной клетчатке и особенно в области лоханок обнаруживались обширные кровоизлияния. Корковое вещество было расширено, дряблое, серо-розового цвета. Пирамиды четко контурированы, темно-красного цвета, местами в области сосочков — кровоизлияния. Слизистая оболочка лоханок содержала множественные кровоизлияния.

В результате патогистологического исследования в почках выявлено неравномерное кровенаполнение, особенно в мозговом слое. На границе коркового и мозгового вещества имелись очаговые кровоизлияния. В мозговом слое сосочки были богаты гомогенным межуточным веществом, которое отделяло друг от друга дистальные каналцы и капилляры мозгового слоя. Эпителий дистальных отделов нефрона претерпевал дистрофические изменения, в проксимальном отделе обнаруживались явления некробиоза. В корковом слое иногда были видны некротические очаговые скопления лимфоидных и плазматических клеток. Извитые каналцы и клубочки — в состоянии некробиоза. Эпителий извитых каналцев набухал. Сохранились только прямые каналцы. Регистри-

ровалась выраженная дистрофия эпителия капсулы Шумлянского, в котором появлялись зернистые включения, иногда в ее просвете возникали полулуния, состоявшие из зернистой массы и некротически измененного слущенного эпителия. Отмечалось утолщение базальной мембраны клубочков, при окраске по Ван-Гизону — выраженная фуксинофилия межуточного коркового слоя. Определялось резкое утолщение капсулы клубочков и стенки артериол за счет накопления ШИК-позитивного материала.

При рентгеноконтрастном исследовании хорошо прослеживались крупные артериальные стволы, более прямолинейные, чем у здорового человека. Отсутствовал переход от крупных сосудов к мелким, отсутствовала мелкая разветвленная сеть в области коркового вещества. Корковое вещество почки несколько увеличивалось в размере, и мелкая разветвленная артериальная сеть прослеживалась в виде нечетких прямых линий. Местами и в корковом, и в мозговом веществе отмечаются участки просветления, вероятно, за счет закупорки сосудов. Доказательством здесь служило и то, что многие артерии обрывались в виде «культи». Видны точечные и более крупные кровоизлияния. Таким образом, у умерших от ГЛПС наибольшие нарушения артериальной сосудистой сети почки наблюдались в области мелких сосудов коркового слоя.

Крупные венозные стволы были расширены, между ними имелись участки просветления (вероятно, за счет закупорки сосудов). Отсутствовала мелкая разветвленная сеть сосудов в корковом слое, отдельные венозные стволы оканчивались «культей». При анализе венозной сосудистой системы почки складывалось впечатление о массивном застое крови в крупных сосудах и непроходимости мелких.

Сердечно-сосудистая система. Из всех наблюдаемых нами больных только 18 предъявили жалобы на колющие боли в области сердца, в 8 случаях отмечалось расширение границ сердца и в 3 — мерцательная аритмия. По уровню и динамике артериального давления больные разделились на три группы. В первой (60–67% наблюдений) давление было нормальным во все периоды болезни и заболевание заканчивалось благоприятным исходом. У больных второй группы (8–10% наблюдений) в конце лихорадочного — начале олигурического периода болезни регистрировалось низкое артериальное давление. У этих больных наблюдались тахикардия, высокий (более $35\text{--}40 \times 10^9/\text{л}$) лейкоцитоз, низкий показатель (60000–80000) уровня тромбоцитов. У больных третьей группы (25–30% наблюдений) в конце лихорадочного — начале олигурического периодов отмечалось увеличение артериального давления, что является одним из факторов риска развития ОПН и эклампсии.

Если клинические проявления поражения сердца при ГЛПС скудны, то данные функционального исследования его разнообразны. В лихорадочном периоде болезни изменения электрокардиограммы отмечались лишь у единичных больных в виде смещения

интервала ST от изоэлектрической линии, замедления внутрижелудочковой проводимости, частичной блокады правой ножки пучка Гиса, гипоксии миокарда и снижения его сократительной способности, замедления атриовентрикулярной проводимости.

Наиболее значительные изменения со стороны сердечно-сосудистой системы выявлялись в олигурическом периоде заболевания. У трети пациентов определялись резко выраженные признаки гипертрофии миокарда желудочков, синусовая брадикардия и аритмия, у половины больных регистрировалось снижение сократительной способности миокарда. У 2 больных зарегистрирована инфарктоподобная электрокардиограмма. В период ранней реконвалесценции вышеперечисленные нарушения оставались, а изменения со стороны миокарда предсердий и желудочков встречались чаще, чем в лихорадочном периоде. Зарегистрированные изменения обуславливались интоксикацией и повышенной проницаемостью сосудов. Через 1–2 года после болезни наблюдалась положительная динамика, которая проявлялась прежде всего нормализацией зубца T. Через 2 года и более каких-либо изменений со стороны сердца мы не находили.

У всех умерших на аутопсии обнаруживались точечные кровоизлияния под перикардом и эндокардом, иногда массивные кровоизлияния под эндокард и в сосочковые мышцы левого желудочка. В половине случаев регистрировались массивные кровоизлияния в правое предсердие и ушко сердца, причем в клинической симптоматике у этих больных преобладала острая сердечная недостаточность в начале олигурического периода болезни, от которой больные погибали. При гистологическом исследовании определялись нарушение кровообращения в микроциркуляторной сети миокарда, полнокровие, отек стромы, мелкие и крупные кровоизлияния, деструкция мышечных волокон и гистиолимфоцитарная очаговая инфильтрация. В эпикарде — кровоизлияния, полнокровие, лейкоцитозы. Найдены обширные участки фрагментации миокарда в левом желудочке. Стенки мелких артерий были гомогенизированы, отмечался умеренный полиморфизм ядер кардиомиоцитов. При заполнении венечных сосудов контрастной массой с последующей рентгенографией выявлены массивное кровоизлияние в области отхождения правой венечной артерии, отсутствие мелкой разветвленной сети, многие сосуды оканчивались «культей» за счет тромбоза.

Легкие. У больных с тяжелым течением ГЛПС наблюдались влажный кашель, одышка, боли в грудной клетке. У 42% пациентов при рентгенографии выявлены «застойные легкие», в 13% наблюдений обнаружены признаки пневмонии. У 19,2% больных развился отек легких, у 5% — явления плеврита, в 2 случаях на вскрытии обнаружены инфаркты легких. При патогистологическом исследовании у всех умерших отмечались полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека, участки ателектаза и эмфиземы, спазм

мелких бронхов, кровоизлияния, отсутствие мелкой сосудистой сети по периферии органа и закупорка сосудистых стволов с резким нарушением кровообращения, в альвеолах — экссудат.

Гипофиз. У всех умерших от ГЛПС наблюдались различной степени выраженности (от мелкоочечных до массивных) кровоизлияния в гипофиз, у отдельных больных кровоизлияния были обнаружены и в ткань в области турецкого седла. По результатам магнитно-резонансной томографии головного мозга и гипофиза регистрировались следующие изменения: наружная гидроцефалия, уменьшение размеров гипофиза, нарушение его дифференциации на переднюю и заднюю доли (т.е. выявлены признаки «синдрома турецкого седла» и мелкоочаговых изменений гипофиза, характерных для кровоизлияния). Эти изменения выявлялись и через 28 лет после перенесенного заболевания.

Таким образом, наблюдающаяся у больных ГЛПС полиорганная недостаточность в разной степени выраженности определяется поражением сосудистого русла органов не только на уровне мелких артерий и вен, но и более крупных сосудов. Это приводит не только к нарушению микроциркуляции, но и к выключению из системы кровообращения части органа с последующим формированием некроза.

Литература

1. Евсеев А.Н. // Дальневосточный журн. инфек. патол. — 2002. — № 1. — С. 61–62.
2. Загидуллин И.М. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (эпидемиология, клиника, осложненная острой почечной недостаточностью) : автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — Уфа, 2001.
3. Сиротин Б.З. Очерки изучения геморрагической лихорадки с почечным синдромом. — Хабаровск : Хабаровское книжное издательство, 2005.
4. Фигурнов В.А., Жаворонков А.А., Пирогов А.Б. и др. // Тер. архив. — 1987. — № 8 — С. 69–70.
5. Фигурнов В.А., Королев Р.В. // Клин. мед. — 1974. — № 10. — С. 133–134.
6. Фигурнов В.А., Крыжановский В.И., Пирогов А.Б. и др. // Клин. мед. — 1985. — № 4 — С. 111–114.

Поступила в редакцию 23.05.2008.

FEATURES OF CLINICAL SIGNS AND PATHOGENESIS AT SEVERE HEMORRHAGIC FEVER WITH NEPHRITIC SYNDROME

V.A. Figurnov, N.A. Marunich, A.V. Gavrilov, E.V. Figurnov
Amur state medical academy (Blagoveshchensk)

Summary — The analysis of clinical features and outcomes at severe hemorrhagic fever with nephritic syndrome is submitted. Some pathogenetic features of illnesses and as the common features in kidneys, hearts and lung lesions are revealed. Macro- and microscopic changes of the basic target-organs including on the posthumous X-rays are analyzed. It is shown, that multi-organ insufficiency at hemorrhagic fever with nephritic syndrome is determined not only by micro-vessels lesions, but also by large intraorgan vessels.

Key words: the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, kidneys, lungs, heart.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-097(571.63)

И.Г. Максема, Г.Г. Компанец, Т.В. Кушнарева, Р.А. Слонова

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, гуморальный иммунитет, серотип/генотип хантавируса.

Представлены результаты изучения динамики антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. По результатам реакции торможения гемагглютинации в отдельных случаях у больных со среднетяжелым течением инфекции выявлен более выраженный иммунный ответ, особенно в начальный период болезни, в отличие от тяжелых форм. Показана значимость использования реакции торможения гемагглютинации для получения информации об участии определенных серотипов/генотипов хантавируса в эпидемическом процессе. Изучена динамика специфических антител у пациентов с различными формами заболевания в реакции нейтрализации. Величина титра нейтрализующих антител существенно не зависела от тяжести течения, однако прослеживалась тенденция к более высокому ее значению у больных с легкими формами заболевания в период разгара болезни и фазу поздней реконвалесценции.

В природных очагах геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) на территории Российской Федерации доказана циркуляция пяти хантавирусов: *Puumala*, *Dobrava/Belgrade*, *Hantaan*, *Amur*, *Seoul*, которые вызывают заболевания разной степени тяжести. На основании сравнения структуры генома вирусной РНК, изолированной из крови больных людей и органов грызунов, выявлены конкретные виды грызунов, источников возбудителей ГЛПС [1, 5]. Установлено, что на очаговых территориях в отдельных географических регионах грызуны — носители определенного генотипа — могут занимать доминирующее положение и определять особенности эпидемиологического и клинического проявления инфекции. В дальневосточном регионе нашей страны в сельских очагах в качестве возбудителя ГЛПС доминируют вирусы *Hantaan* (геновариант *Far East*), и *Amur*, грызуны-носители которых — *Apodemus agrarius* и *Apodemus peninsulae* соответственно [4]. В очаге городского типа в Приморском крае этиологию заболевания в основном определяет вирус *Seoul*. В то же время часть случаев в городском очаге (около 34,4%) среди лиц, выезжавших за 2–3 недели до заболевания в природные очаги, была обусловлена вирусами *Hantaan* и *Amur* [1]. Таким образом, мозаичность распространения хантавирусов в природных очагах ГЛПС диктует необходимость их типирования для получения адекватной информации об участии определенного возбудителя в эпидемическом процессе в Приморском крае.

Известно, что значительные серологические перекрестные реакции между близкородственными

хантавирусами затрудняют постановку этиологического диагноза ГЛПС с помощью таких широко используемых методов диагностики, как непрямой метод флюоресцирующих антител и иммуноферментный анализ, и что реакция нейтрализации малоэффективна на ранней стадии заболевания, поскольку нейтрализующие антитела к гомологичному вирусу, как правило, образуются в поздние сроки болезни. Ранее при исследовании сывороток крови от больных была показана возможность использования реакции торможения гемагглютинации не только для серодиагностики, но и для установления антигенных взаимосвязей между штаммами хантавирусов и определения типовой принадлежности штамма, вызвавшего заболевание [1, 3, 14]. Последнее обусловлено тем, что оболочечные гликопротеины G1 и G2 хантавирусов обладают гемагглютинирующей активностью и индуцируют pH-зависимое клеточное взаимодействие, играющее важную роль в прикреплении вируса к поверхности чувствительных клеток. С. Schmaljohn также полагает, что иммуногенная роль принадлежит обоим гликопротеинам [12].

Несмотря на очевидное сходство ведущего симптомокомплекса болезни, особенности клинических проявлений ГЛПС, тяжесть и прогноз течения инфекции зависят не только от антигенной вариабельности возбудителя, но и связаны с другими факторами, в том числе со способностью иммунной системы больного модулировать специфический ответ. Согласно рабочей гипотезе ведущим механизмом патогенеза ГЛПС является сложный комплекс нарушений преимущественно клеточного звена иммунитета [2]. Однако С. Schmaljohn et al. (1986) и J. Arikawa et al. (1990) показали в экспериментальных исследованиях значение антител к нуклеокапсидному белку N в защите от хантавирусной инфекции животных [6, 13]. Эффективность защиты рекомбинантного белка N при заражении лабораторных животных хантавирусами, на фоне отсутствия специфических антител к белкам оболочки вириона G1 и G2, была показана также А. Lundkvist et al. [11]. Эти данные подтверждают важную роль гуморального звена иммунитета в защите от хантавирусной инфекции.

Целью нашей работы была оценка динамики формирования и сохранения специфических антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител у больных ГЛПС на различных территориях Приморского края, а также определение значения гуморального

Таблица 1

Динамика накопления специфических антигемагглютининов у больных ГЛПС в зависимости от тяжести и периода болезни

Течение заболевания	СГТ антител в разные периоды болезни, log ₂				
	1–7-й день	8–14-й день	15–21-й день	21–30-й день	более 1 мес.
Тяжелое (n=36)	7,6±0,45	8,4±0,55	8,5±0,51	9,1±0,50	9,3±0,33
Среднетяжелое (n=69)	8,3±0,38	8,5±0,27	8,9±0,35	9,3±0,42	8,9±0,36
p*	0,26	0,99	0,52	0,84	0,55
Всего (n=105):	7,9	8,5	8,8	9,3	9,0

* Значимость различий между показателями у больных с тяжелым и среднетяжелым течением инфекции.

иммунного ответа макроорганизма в патогенезе инфекции, вызванной различными серотипами хантавируса.

Исследован 161 образец сыворотки крови, взятой от больных ГЛПС в динамике заболевания из разных районов Приморского края. Наличие антител к хантавирусам подтверждено непрямым методом флюоресцирующих антител.

Для определения вируснейтрализующих антител использовали метод FRNT (Focus Reduction Neutralization Test), предложенный P.W. Lee et al. [9]. В его основе лежит выявление фокусов инфицированных клеток, сформированных при размножении хантавируса на культуре клеток под полужидким покрытием. Разведение сыворотки, дающее не менее 80% снижения числа фокусов, по сравнению с отрицательной сывороткой, считали ее нейтрализующим титром.

В работе использовали геагглютинирующие антигены штаммов хантавирусов, циркулирующих в Приморском крае: *Hantaan* – геновариант *Far East*, *Amur*, *Seoul* – геновариант *Vladivostok*. Все этапы реакции торможения геагглютинации – разведение сыворотки, определение рабочей дозы геагглютинирующих антигенов, – а также сроки инкубации и контроль проводили согласно описанной методике [3]. Титром антигеагглютининов считали наивысшее разведение сыворотки крови, которое вызывало полную или почти полную задержку агглютинации эритроцитов. Основанием для постановки этиологического диагноза ГЛПС являлась 4-кратная разница в титре антигеагглютининов к антигенам гомологичного и гетерологичного вирусов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Биостат». Для проверки достоверности результатов использовали критерий Стьюдента.

Антигеагглютинины в крови больных ГЛПС появлялись на 4–6-й день от начала заболевания (лихорадочный период), увеличивались в титре на 8–15-й день (поздняя олигурическая и ранняя полиурическая стадия), достигали максимума к 21-му дню (стадия выздоровления) и оставались на высоком уровне до 30-го дня, после чего наступало их незначительное снижение. Средняя геометрическая титров (СГТ) антител существенно не отличалась у больных с тяжелыми и

среднетяжелыми формами болезни. В то же время при среднетяжелых случаях ГЛПС мы наблюдали тенденцию к более выраженному иммунному ответу, особенно в начальный период болезни в отличие от тяжелых форм. Установлено, что в сыворотках крови пациентов, полученных в фазу поздней реконвалесценции через 5–11 мес. и 5 лет после перенесенного заболевания, уровень антигеагглютининов оставался высоким независимо от тяжести инфекции (табл. 1).

Анализируя клиническое значение антигеагглютининов, Z. Liu et al. (1992) показали сходную динамику формирования геагглютинирующих антител в течение болезни при всех формах, отметив при этом значительные отличия у больных с ургентными состояниями: титры антител в их сыворотках падали с увеличением срока заболевания [10].

В результате серотипирования сывороток крови от 80 больных ГЛПС из сельских районов Приморского края и г. Владивостока в 32 случаях заболевания установлена этиологическая роль вируса *Far East*, в 34 случаях – вируса *Amur*, в 14 случаях – вируса *Seoul*. В сельских районах края случаи заболевания, обусловленные вирусом *Amur*, составили 59,3%, этиологическая роль вируса *Far East* установлена у 40,7% больных ГЛПС. Однако, на наш взгляд, оценка данного показателя будет более точной при использовании его в пределах выделенных очаговых регионов и эпидемических районов. Так, например, в 2002–2003 гг. по данным серотипирования заболеваемость ГЛПС была связана в большей степени с вирусом *Far East*, чем *Amur*, хотя среднегодовой показатель инфицированности *A. agrarius* был в 1,7 раза ниже, чем *A. peninsulae* ($p < 0,05$). При анализе данных эпиданамнеза оказалось, что заражение этой группы больных произошло в лугополевых биотопах центральных районов края, где доминировала по численности и инфицированности *A. agrarius*. Доля инфицированных грызунов этого вида в отловах составила 42,3%, в то время как доля инфицированных *A. peninsulae* – 5,8%. В 2004 г. в этиологической структуре заболеваемости ГЛПС (по результатам реакции торможения геагглютинации) преобладали случаи, обусловленные вирусом *Amur*, что было связано с активацией эпизоотического процесса в популяции восточно-азиатской мыши (*A. peninsulae*). Доля инфицированных *A. agrarius* и *A. peninsulae* в лугополевых биотопах со-

ставила 61 и 5,6% соответственно. Напротив, в лесных биотопах (преобладающих в северных районах края) доля инфицированных *A. agrarius* равнялась 5,2%, а *A. peninsulae* — 79%. В 2005 г. серологическое подтверждение участия вируса *Amur* в заболеваемости ГЛПС по краю составило 61,3%, чему предшествовало преобладание *A. peninsulae* над *A. agrarius* по численности и инфицированности.

В сыворотках крови больных, заражение которых произошло в природных очагах, где доминировала среди отловленных животных *A. peninsulae*, СГТ антител к гомологичному антигену была в 1,9 раза выше. У больных, проживающих на очаговых территориях, где первостепенное значение как резервуару вируса принадлежит *A. agrarius*, уровень титра антител к гемагглютинирующему антигену вируса *Far East* также был почти в 2 раза выше. При серотипировании сывороток крови 17 больных ГЛПС, зарегистрированных во Владивостоке, СГТ антител к гемагглютинирующему антигену *Seoul* составила 8,9 $\log_2$, а к антигенам *Far East* и *Amur* в 1,5 и 3 раза ниже соответственно (табл. 2).

Возможность типирования антигенов хантавирусов была изучена нами в реакции нейтрализации, т.к. к настоящему времени известно, что более высокие титры антител формируются к геноварианту, непосредственно вызвавшему заболевание [1].

В результате исследования сывороток крови от 60 больных из сельских районов Приморского края и г. Владивостока в 32 случаях заболевания по разнице титра антител установлена этиологическая роль вируса *Seoul*, в 19 случаях — вируса *Far East*. Количество сывороток с неустановленными и незначительно отличающимися титрами нейтрализующих антител равнялось 9. Среди 35 больных, зарегистрированных во Владивостоке, случаи заболевания, обусловленные вирусом *Seoul*, составили 82,9%, а вирусом *Far East* — 14,3%.

При изучении структуры генома хантавирусов было установлено наличие нейтрализующих эпитопов как на оболочечном гликопротеине G2, так и на нуклеокапсидном белке N [12]. Вследствие различия антигенных детерминант, а также возможной вариации аминокислотного состава белков оболочки вириона хантавируса, формирующиеся к ним специфические антитела, возможно, обладают различной нейтрализующей способностью, что находит отражение в клинической картине заболевания.

По данным ряда авторов [7, 15], титр нейтрализующих антител в сыворотках больных с тяжелым течением хантавирусной инфекции значительно ниже, чем при среднетяжелых и легких формах болезни, что подтверждает высокую способность нейтрализующих антител к связыванию и выведению вируса из организма. W. Fan et al. [8] отмечали низкие значения нейтрализующих антител у обследованных с легкой и тяжелой формами ГЛПС, в то же время у больных со среднетяжелой формой их титр был незначительно

Таблица 2
Уровень специфических антигемагглютининов у больных ГЛПС из разных районов края к гомо- и гетерологичному антигенам

Тип очага	Кол-во обследованных	СГТ специфических антител к антигенам, $\log_2$		
		Far East	Amur	Seoul
Степной	31	8,6 $\pm$ 0,29	4,6 $\pm$ 0,50	н/о
Лесной	32	4,3 $\pm$ 0,48	8,3 $\pm$ 0,34	н/о
Владивосток	17	5,5 $\pm$ 0,60	3,1 $\pm$ 1,20	8,9 $\pm$ 0,25

Примечание. Различие между СГТ антител к антигенам между *Far East* и *Amur*, *Far East* и *Seoul*, *Amur* и *Seoul* статистически значимо;

н/о — не определено.

Таблица 3
Динамика титров нейтрализующих антител у больных ГЛПС в зависимости от тяжести и периода болезни

Течение заболевания	СГТ антител в разные периоды болезни, $\log_2$		
	14–21-й день	22–30-й день	более 1 мес.
Тяжелое	7,5 $\pm$ 0,27	7,8 $\pm$ 0,63	7,0 $\pm$ 0,42
Среднетяжелое	7,5 $\pm$ 0,33	7,7 $\pm$ 0,40	8,2 $\pm$ 0,48
Легкое	8,0 $\pm$ 0,38*	7,7 $\pm$ 0,34	8,5 $\pm$ 0,53*

* Различия с тяжелой формой заболевания статистически значимы.

выше. Титр антител увеличивался в течение болезни, достигая максимума на 15–16-й день, и стабилизировался, однако авторы обнаружили нехарактерную динамику антителообразования у крайне тяжелых больных и в летальных случаях, что свидетельствует о возможном прогнозе заболевания и имеет большое клиническое значение.

Изучая динамику нейтрализующих антител у больных с различным клиническим течением инфекции, мы обнаружили их наличие к концу 2-й недели заболевания у 92% обследованных, к концу 3-й — у 96,8%, 4-й — у 98,4%. Величина титра нейтрализующих антител существенно не зависела от тяжести течения инфекции, однако более высокий титр отмечался у больных с легкими формами заболевания в период разгара болезни и фазу поздней реконвалесценции (табл. 3).

Таким образом, изучение гуморального иммунитета у больных ГЛПС дает возможность при исследовании сывороток больных в реакции торможения гемагглютинации в ранние сроки заболевания быстро получить информацию об участии определенных серотипов/генотипов хантавируса в эпидемическом процессе. С помощью выявления нейтрализующих антител можно получить окончательное заключение об этиологическом агенте, вызвавшем заболевание. Результаты нашего исследования сывороток крови, взятых в динамике заболевания, показали, что в отдельных случаях увеличение титра специфических

антител у больных ГЛПС отмечалось на фоне уменьшения тяжести заболевания.

Литература

1. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / под ред. Р.А. Слоновой, Е.А. Ткаченко, В.А. Иванис и др. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2006.
2. Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника, иммунокорректирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом в регионе циркуляции разных серотипов хантавирусов : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Владивосток, 2004.
3. Кушнарева Т.В. Гемагглютинирующие свойства хантавирусов и получение специфического диагностикума : автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2002.
4. Слонова Р.А., Кушнарева Т.В., Компанец Г.Г. и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2006. — № 3. — С. 74–77.
5. Ткаченко Е.А., Деконенко А.Е., Дзагурова Т.К. и др. // Хантавирусы и хантавирусные инфекции / под ред. Р.А. Слоновой, В.А. Иванис. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2003.
6. Arikava J., Lapenotiere H.F., Iacono-Connors L. et al. // *Virology*. — 1990. — Vol. 176, No. 1. — P. 114–125.
7. Bharadwaj M., Notchissey R., Goade D. et al. // *J. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 182. — P. 43–48.
8. Fan W., Zhang C., Nie Z. et al. // 2nd Inter. Conf. «Hemorrhagic fever with renal syndrome» : abstracts. — Beijing, China, 1992. — P. 34.
9. Lee P.W., Gibbs C.J., Gajdusek C. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1985. — Vol. 22, No. 9. — P. 940–944.
10. Liu Z., Fan W., Zang C. // 2nd Inter. Conf. «Hemorrhagic fever with renal syndrome» : abstracts. — Beijing, China, 1992. — P. 35.
11. Lundkvist A., Kallio-Kokko H., Sjolander K.B. et al. // *Virology*. — 1996. — Vol. 15, iss. 216, No. 2. — P. 397–406.
12. Shmaljohn C.S. // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — Vol. 25, iss. 18, No. 22. — P. 6728.
13. Shmaljohn C.S., Jennings G.B., Hay G., Dalrymple J.M. // *Virology*. — 1986. — Vol. 155, No. 2. — P. 633–643.
14. Tang Y.W., Li Y.L., Ye K.L. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1991. — Vol. 29, No. 9. — P. 1924–1927.
15. Tang Y., Yang W., Bai X. // 2nd Inter. Conf. «Hemorrhagic fever with renal syndrome»:Abstracts. — Beijing, China, 1992. — P. 38.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

HUMORAL FACTORS OF THE IMMUNE ANSWER AT PATIENTS WITH HEMORRHAGIC FEVER WITH NEPHRITIC SYNDROME IN PRIMORSKI KRAI

I.G. Maksema, G.G. Kompanets, T.V. Kushnareva, R.A. Slonova
Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok)

Summary — Results of studying of changes of the anti-hemo-agglutinating and neutralization antibodies at patients with the hemorrhagic fever with nephritic syndrome are submitted. By results of reaction of braking of hemagglutination on occasion at patients with moderate infection the more expressed immune answer is revealed, especial in an initial stage of illness, as against severe forms. The importance of use of reaction of braking of hemagglutination for the information on participation of the certain serotypes/genotypes of hantavirus in epidemic process is shown. Changes of specific antibodies at patients with various forms of disease in reaction of neutralization is investigated. The level of antibodies titer essentially did not depend on severity; the tendency to its higher value at patients with easy forms of disease however was traced in peak of illness and a phase of recovery.

Key words: the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, humoral immunity, serotype/genotype of hantavirus

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 79–82.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-036.22

О.В. Иунихина, Г.Г. Компанец, Р.А. Слонова

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ЗАРАЖЕНИЯ ХАНТАВИРУСАМИ

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, условия контакта с патогеном, тяжесть клинического течения.

Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ 530 историй болезни больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом за 1986–2006 гг. из очагов циркуляции вирусов Хантаан и Амур. Полученные данные показывают, что тяжесть клинического течения инфекции зависит от длительности и условий контакта с патогеном. Работа в условиях повышенного пылеобразования или длительное пребывание в лесу приводят к более тяжелому течению хантавирусной инфекции. Оценка профессиональной принадлежности больных и условий заражения позволили выделить группу повышенного риска заражения хантавирусной инфекцией в Приморском крае.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — широко распространенное в странах Евразии, в том числе на юге Дальнего Востока России, а также в сопредельных странах — Китае и Корее — природно-очаговое заболевание. В азиатском регионе нередко отмечаются тяжелые формы ГЛПС с высокой летальностью (от 0,5 до 12%), в основном обусловленные вирусом Хантаан [8, 15]. В европейских очагах хантавирусной инфекции случаи заболевания, обусловленные вирусом Пуумала, протекают значительно легче, и летальность здесь не превышает 0,02 %, в то же время в очагах циркуляции вируса Добrava у 12%

Таблица

Тяжесть течения ГЛПС в зависимости от условий контакта с возбудителем

Условия контакта	Группа, кол-во больных	Кол-во наблюдений, % (M±m)			Летальность, %
		легкое течение	среднетяжелое течение	тяжелое течение	
Кратковременный	1-я, 75	6,7±2,9	68,0±5,4	25,3±5,0	—
Частый и длительный	2-я, 137	8,8±2,4	45,2±4,2	46,0±4,3	2,9
В условиях повышенного пылеобразования	3-я, 318	5,0±1,2	32,7±2,6	62,3±2,7	7,5
Всего:	530	6,2±1,0	41,0±2,1	52,8±2,2	5,3

больных ГЛПС отмечаются тяжелые формы [6, 8, 13]. Предполагают, что тяжесть клинического течения хантавирусной инфекции может быть обусловлена различной вирулентностью штаммов отдельных серотипов хантавирусов, а также генетической предрасположенностью, пожилым возрастом и сопутствующей хронической почечной патологией больных [2, 14].

В Приморском крае тяжелые формы ГЛПС (27%), обусловленные вирусами Хантаан и Амур, носителями которых являются полевая (*Apodemus agrarius*) и восточно-азиатская (*Apodemus peninsulae*) мыши, довольно часто регистрируются в сельских очагах хантавирусной инфекции [2, 5]. В отдельные годы летальность от ГЛПС, обусловленной этими вирусами, достигала в регионе 8–12%. Более легкие случаи заболевания в крае связаны с вирусом Сеул — геновариант *Vladivostok*, циркулирующим в популяциях городских серых крыс *Rattus norvegicus*, хотя встречались и тяжелые формы инфекции, ассоциированные с этим геновариантом [4].

Основным путем заражения хантавирусами людей является аэрогенный — вдыхание пылевых частиц, загрязненных выделениями грызунов. В пользу этого пути свидетельствуют случаи ГЛПС среди работников вивариев и экспериментаторов, работающих с лабораторными животными разных видов, зараженных хантавирусами [1, 9, 11]. Прямое доказательство возможности аэрогенной передачи хантавируса было подтверждено его выделением на клетках Vero E6 из проб воздуха, собранных в комнате, где содержались зараженные животные [12]. На аэрогенное заражение косвенно указывают также данные J. Hjelle [10] и L. Armstrong et al. [7], которые, проанализировав случаи заболевания ХЛС, обусловленные вирусом Син Номбре, показали, что большинство больных были инфицированы при уборке жилых и рабочих помещений, заселенных грызунами.

В работах ряда авторов приводятся сведения о связи ГЛПС у определенной категории людей с условиями заражения хантавирусами (сбор хвороста, рубка кустарников, уход за сельскохозяйственными животными, работа в зернохранилищах, уборка помещений), не исключая факта повышенного пылеобразования при выполнении этих работ [2, 3, 6–8, 15]. В то же время данные о влиянии условий заражения и продолжительности контакта заболевше-

го с патогеном на тяжесть клинических проявлений ГЛПС пока не приводились.

Цель нашей работы — выявить зависимость тяжести клинического проявления ГЛПС от различных условий заражения больных и длительности сроков возможного контакта с хантавирусами.

Нами ретроспективно проанализировано 530 историй болезни пациентов с ГЛПС, проживавших во всех административных районах края, госпитализированных в лечебные учреждения с 1986 по 2006 г. В каждом случае диагноз был подтвержден серологически и имелись сведения о месте и условиях заражения, характере выполняемой работы. Из жителей Владивостока в анализ были включены только случаи среди заразившихся за пределами города в очагах циркуляции вирусов Хантаан и Амур.

Больные ГЛПС по условиям заражения были разделены на три группы. В первую вошли 75 человек, кратковременно (в среднем 1–2 дня) посещавших природные очаги ГЛПС с целью отдыха, рыбалки, охоты. Вторую группу составили 137 лиц, длительно (неделя и более) остававшихся в лесу в непригодных помещениях (палатки, охотничьи домики, зимовье, бараки), где нередко отмечали присутствие грызунов или следов их жизнедеятельности. В третьей группе (138 человек) больные по роду производственной деятельности были связаны с условиями постоянного повышенного пылеобразования, независимо от длительности контакта. Сюда включены лица, работавшие в закрытых помещениях (кочегары, шахтеры, работники зерно- и овощехранилищ), работники, ухаживавшие за сельскохозяйственными животными или занятые на уборке помещений, в которых отмечалось наличие грызунов, а также обработчики кедровых шишек (первая подгруппа, 126 человек) и люди, работавшие на эндемичной территории в условиях открытой местности (строители, заготовители сена, дров, пасечники, полеводы, трактористы и грузчики — вторая подгруппа, 192 человека).

Статистическую обработку полученных данных проводили общепринятыми методами, достоверность оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Тяжелая форма ГЛПС была зарегистрирована у 52,3% пациентов (табл.). В первой группе среднетяжелое течение регистрировались достоверно чаще, чем

тяжелое, летальных случаев не отмечалось. Во второй группе процент больных со среднетяжелым и тяжелым течением был практически одинаковым. В третьей группе тяжелая форма геморрагической лихорадки с почечным синдромом наблюдалась довольно часто и чаще, чем в первой и второй группах. Показатель летальности в третьей группе был в 2,5 раза больше, чем во второй. В то же время при анализе тяжести течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом в третьей группе отмечено, что при выполнении работ на открытой местности процент больных с легкими формами был достоверно выше, чем при работе в закрытых помещениях. Количество тяжелых форм и показатель летальности в обеих подгруппах были примерно одинаковы.

У определенной части больных из сельской местности геморрагическая лихорадка с почечным синдромом была связана с заражением в бытовых условиях (11,7%), без посещения до заболевания природных очагов. Это объясняется тем, что в осенне-зимний период происходит миграция и концентрация диких мышей, в том числе и инфицированных, в дома и надворные постройки. Тяжелые формы заболевания среди представителей этой группы наблюдались в 35,5% случаев, при этом более чем у половины заболевших четко прослеживался воздушно-пылевой путь заражения (уборка жилых помещений и гаражей, разбор теплиц и сараев).

У 39,2% больных (208 человек) заражение произошло в лесных очагах на охоте, рыбалке, длительном пребывании в зимовье и на пасеке, причем треть из них (74 человека) занималась сбором дикоросов и дров. При постоянной работе на полях, фермах, зерно- и овощехранилищах, при работе с кормами животных, на складах, где регистрировалось наличие грызунов, заразились 22,1% заболевших (117 человек). У 55 пациентов (10,4%) заражение было связано с выполнением работ в лесных очагах края (лесники, лесорубы, геологи, строители). У 50 больных (9,4%) заражение могло произойти во время работы в подземных помещениях (шахтах), подвалах, гаражах, где также отмечалось наличие грызунов. 38 человек (7,2%) связывали свое заболевание с работой на дачных участках.

По результатам анализа профессионального состава среди больных второй и третьей групп заболевших выделена группа лиц, у которых тип выполняемых работ способствовал заражению хантавирусом. Сюда вошли работники сельского хозяйства (животноводы, полеводы, работники зернохранилищ, трактористы) — 16,5%, военнослужащие на полевых учениях — 11%. Строители линий электропередачи и дорог, золотодобытчики, работавшие в очагах хантавирусной инфекции, составили 7,2%, грузчики — 6,6%, работники леспромхозов и охотхозяйств — 4,6%, пасечники — 2,6%, геологи — 1,5%, кочегары — 1,3% и шахтеры — 0,4%. Лица перечисленных профессий составляют в Приморском крае группу повышенного риска заражения.

Однако возможность заразиться хантавирусной инфекцией на эндемичной территории имеют не только профессиональные, но и все социальные слои населения. Так, по нашим данным, высокий процент заболевших ГЛПС составляли временно неработающие (14,3%), пенсионеры (13,8%), а также учащиеся (10,3%). Это связано с пребыванием данной категории лиц на эндемичной территории в лесной зоне при заготовке дикоросов, на личных пасеках и дачных участках, при прохождении полевой практики и отдыхе в оздоровительных лагерях.

Характерно, что больше половины ($54,3 \pm 2,2\%$) заболевших ГЛПС с 1986 по 1995 г. составили лица, профессиональная деятельность которых была связана с пребыванием и работой в сельскохозяйственных и лесных очагах хантавирусной инфекции и в $12,6 \pm 1,4\%$ случаев — с кратковременным посещением леса во время отдыха, рыбалки, сбора дикоросов. В то же время в последнее десятилетие (1996—2006) в силу сложившихся социально-экономических условий (широкое оснащение населения личным автотранспортом, частые выезды на природу, сокращение объектов сельского хозяйства) участились случаи ГЛПС ($44,1 \pm 2,1\%$) после кратковременного отдыха в лесу или сбора дикоросов, в то время как доля случаев, связанных с профессиональной деятельностью, достоверно снизилась (до $15,4 \pm 1,6\%$).

Среди проанализированных случаев достоверно чаще встречались мужчины — $90,4 \pm 1,3\%$, доля женщин составила только $9,6 \pm 1,3\%$. Основную группу среди заболевших составили лица в возрасте 15—50 лет (85,8%), дети до 14 лет болели редко (1,5%), как и люди старше 71 года (0,2%). Достоверных различий в половом и возрастном составе пациентов, вошедших в разные группы, выявлено не было.

При анализе географического распространения заболеваемости было отмечено, что наибольшее число случаев ГЛПС (85,9%) и летальных исходов (83,3%) было выявлено среди жителей территорий, отнесенных к зонам высокого и среднего риска заражения [2].

Общепризнанный в настоящее время воздушно-пылевой путь заражения хантавирусом человека подтверждается многочисленными эпидемиологическими наблюдениями. Реализации этого пути заражения обычно предшествует выполнение в очагах инфекции работы, связанной с пылеобразованием. Исследования показали, что, как правило, заражение людей хантавирусами происходит при выполнении определенных видов работ: сбор дикоросов, работа в зерно- и овощехранилищах, уход за сельскохозяйственными животными, строительство объектов в лесной зоне, перевозка сена и фуража, геологические изыскания, во время полевых работ и лагерных сборов военнослужащих на эндемичных территориях в местах обитания и концентрации грызунов — носителей хантавируса [2, 3, 6—8, 15]. Значительную долю

среди заболевших геморрагической лихорадкой с почечным синдромом составляют лица, кратковременно посещающие очаговую территорию. Так, по данным Е.А. Ткаченко и др. [6], заболевания во время вспышки геморрагической лихорадки с почечным синдромом развились среди лиц, занятых уходом за скотом, разбором и перевозом сена и соломы, оставивавшихся на отдых у стогов сена (т.е. деятельность которых не исключала пылеобразование различной интенсивности). Однако данных о влиянии условий выполняемой работы и ее продолжительности на тяжесть клинического течения и исход заболевания авторы не приводили.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что длительное нахождение лиц перед заболеванием в природных очагах инфекции и работа, связанная с повышенным пылеобразованием, как правило, являются причиной развития более тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванной серотипами Хантаан и Амур. Такие условия, по всей видимости, не только увеличивают частоту возможного контакта с возбудителем, но и могут способствовать получению значительной дозы хантавируса, попадающей в организм человека при вдыхании пыли, контаминированной выделениями грызунов. При этом на фоне одинакового уровня тяжелых форм геморрагической лихорадки с почечным синдромом и показателя летальности у работающих на открытой местности процент легких форм заболевания как косвенный показатель ее тяжести был достоверно выше, чем у тех, кто работал в закрытых помещениях. Ранее было показано, что среди жителей городского очага при ГЛПС, ассоциированной с вирусом Сеул, тяжелые формы инфекции наблюдались у лиц, работа которых была связана с частым пребыванием в подвальных помещениях или с уборкой жилых и рабочих помещений, где отмечалось присутствие серых крыс — носителей вируса Сеул [4].

Тяжелая форма ГЛПС среди анализируемых нами случаев наблюдалась у 25,3% заболевших даже после однократного кратковременного пребывания в природном очаге. Как правило, такие больные указывали на присутствие грызунов в местах заражения. Не исключено, что в подобных случаях заболевшие могли случайно оказаться в местах концентрации инфицированных хантавирусом грызунов. Необходимо отметить, что летальных случаев среди этой группы лиц мы не наблюдали.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о влиянии сроков пребывания в очагах хантавирусной инфекции и характера выполняемых работ на тяжесть течения и исход геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Поэтому важно при сборе эпидемиологического анамнеза не только иметь сведения о месте, где мог заразиться пациент, но и знать условия, при которых могло произойти инфицирование.

Литература

1. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / Слонова Р.А., Ткаченко Е.А., Иванис В.А. и др. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2006.
2. Кулагин С.М., Федорова Н.И., Кетиладзе Е.С. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 1967. — № 10. — С. 124–127.
3. Природно-очаговые инфекции в России: современная эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения / Хотько Н.И., Матусевич Л.Е., Довло А.Д. и др. — Омск : Изд-во ОГМА, 1998.
4. Слонова Р.А., Компанец Г.Г., Подогова Л.М. и др. // Вopr. вирусол. — 1999. — № 5. — С. 213–217.
5. Слонова Р.А., Кушнарева Т.В., Компанец Г.Г. и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2006. — № 3. — С. 74–77.
6. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К. и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2005. — Т. 23, № 4. — С.28–34.
7. Armstrong L.R., Zaki S.R., Goldoft M.J. et al. // J. Infect. Dis. — 1995. — Vol. 172. — P. 1166.
8. Clement J. P. // Antiviral Res. — 2003. — Vol. 57. — No. 1–2. — P. 121–127.
9. Desmyter J., LeDuc J., Johnson K. et al. // Lancet — 1983. — P. 1445–1448.
10. Hjelle B., Glass G.E. // J. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 181. — P. 1569–1573.
11. Lee H.W., Johnson K.M. // J. Infect. Dis. — 1982. — Vol. 146. — P. 645–651.
12. Luo Z., Liu Y.F. // Proceedings of Int. Symp. on Hemorrhagic Fever with renal syndrome. — Hubei (China), 1988. — P. 34.
13. Mc Caughey C., Hart C.A. // S. Med. Microbiol. — 2000. — Vol. 49. — P. 587–599.
14. Mustonen J., Partanen J., Kanerva M. et al. // Kidney Int. — 1996. — Vol. 49, No. 1. — P. 217–221.
15. Schmaljohn C., Hjelle B. // Emerging Infect. Dis. — 1997. — Vol. 3, No. 2. — P. 95–104.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF THE HEMORRHAGIC FEVER WITH NEPHRITIC SYNDROME UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF INFECTION BY HANTAVIRUSES

O.V. Iunihina, G.G. Kompanets, R.A. Slonova
Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok)

Summary — The retrospective epidemiological analysis of 530 case records of patients with the hemorrhagic fever with nephritic syndrome for 1986–2006 from the reservoirs of circulation of viruses Hantaan and Amur is done. The received data show, that severity of an infection depends on duration and conditions of contact with pathogen. The work in conditions of high dusty or long stay in a wood result in more severe hantavirus infection. The estimation of the occupation of patients and conditions of infection has allowed allocating the group of the increased risk of Hantavirus infection in Primorsky Krai.

Key words: the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, conditions of contact with pathogen, severity.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-085.37:582.272.4]-092.4

И.Г. Максема, И.Д. Макаренкова

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОИДАНОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ХАНТАВИРУСОМ

Ключевые слова: хантавирусная инфекция, фукоидан, макрофаг.

Исследована вирусингибирующая активность фукоиданов бурых водорослей с учетом их структурных особенностей в опытах *in vivo* при хантавирусной инфекции у мышей. Установлено, что фукоиданы из бурых водорослей *Laminaria japonica* и *Laminaria cichorioides* обладают свойством подавлять инфекционность хантавируса в отношении перитонеальных макрофагов мышей преимущественно в начальную фазу инфекционного процесса. Положительный эффект фукоиданов из фукусовых и ламинариевых водорослей в той или иной степени был выявлен для каждого из испытанных препаратов на 10, 14 и 21-е сутки. Высокая противовирусная активность препаратов в разгар инфекции (10–14-й день) связана, по-видимому, с их иммуномодулирующим действием.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) входит в группу хантавирусных инфекций и регистрируется в России на многих территориях, включая европейскую часть страны и районы Дальнего Востока. Разнообразная клиническая картина, нередкое возникновение неотложных состояний у больных обуславливают сложность терапии и делают лечение этого природно-очагового заболевания важной проблемой для здравоохранения России [1].

Большинство авторов придают ведущее значение патогенетической терапии с учетом главных клинико-патогенетических синдромов болезни. В то же время в последние годы все большую популярность завоевывает этиотропное лечение и терапия иммуномодулирующими препаратами [1, 2]. Известно, что оболочечные гликопротеины G1 и G2 хантавирусов ответственны за взаимодействие вируса с рецепторами цитоплазматических мембран. Проникновение вируса в клетку-мишень осуществляется путем рецепторно-опосредованного эндоцитоза, с помощью β 3-интегринов, которые являются оболочечными поверхностными рецепторами эндотелиальных клеток, тромбоцитов и макрофагов [1, 8, 9].

При наличии чувствительных клеток и условий для репродукции вируса достаточно прервать первую стадию прикрепления вирусных частиц к поверхности клетки, чтобы остановить развитие вирусной инфекции задолго до мобилизации специфических механизмов иммунологической защиты организма. Существуют два различных по патогенетическим точкам приложения способа защиты от хантавирусной инфекции: путем воздействия на рецепторы вируса [9] и за счет блокады клеточных рецепторов [8]. В обоих случаях блокируются начальные этапы вирусной репродукции, связанные с прикреплением вируса к оболочке восприимчивой клетки и его внедрением в цитоплазму.

По результатам изучения процессов, протекающих в инфицированных вирусами клетках, известно, что нарушение нормальной конфигурации клеточных мембран вызывает снижение способности чувствительных клеток адсорбировать вирус, что, вероятно, связано с уменьшением количества клеточных рецепторов [4]. В этом плане несомненный интерес представляет группа сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей – фукоиданов, способных избирательно реагировать с некоторыми белками и специфически модифицировать клеточную поверхность [5]. Фукоиданы представляют большой практический интерес благодаря широкому спектру биологической активности: антикоагулянтной, иммуномодулирующей, антипролиферативной, противоопухолевой, противовоспалительной, противовирусной и т.д. [5]. Известно, что фукоиданы из ламинариевых и фукусовых водорослей различаются по степени сульфатирования, молекулярной массе, моносахаридному составу, что, очевидно, является следствием существенных различий в путях биосинтеза данных полисахаридов и причинах проявляемой ими той или иной биологической активности [5].

Нами ранее были получены интересные данные о влиянии сульфатированных полисахаридов на адсорбцию вируса Хантаан, возбудителя ГЛПС, в опытах *in vitro* [3]. Недавно Ф.А. Фадеевым и др. [6] были представлены данные о возможности изменения рецепторной специфичности энтеровирусов при репродукции *in vitro* и *in vivo*. Резонно предположить, что изменчивость данного признака при репродукции *in vivo* может играть существенную роль и в патогенезе хантавирусной инфекции.

Целью настоящей работы было изучение вирусингибирующей активности фукоиданов бурых водорослей с учетом их структурных особенностей в опытах *in vivo*.

В эксперименте использовали вирус Хантаан (прототипный штамм 76-118, выделенный от полевой мыши *Apodemus agrarius koreae*, Корея) в титре 3,1 фокус-формирующие единицы/мл.

Животные: неинбредные мыши-самцы, массой 16–18 г. Мыши содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Мышей выводили из опыта эфирным наркозом, согласно правилам работы с экспериментальными животными.

Таблица

Влияние фукоиданов на число инфицированных вирусом Хантаан макрофагов у мышей (нМФА), %

Группа	Число инфицированных макрофагов в различное время с момента заражения (M±m)												
	часы								сутки				
	0,5	1	2	4	6	24	48	72	7	10	14	21	35
1-я	57±3,6	49±5,0	16±2,6	61±5,5	50±3,6	33±3,7	19±3,9	24±4,3	54±4,1	59±4,9	50±5,0	23±4,2	35±4,8
2-я	10±2,2	26±4,4	11±2,3	25±4,3	26±3,1	33±3,2	45±4,9	20±4,0	40±3,7	20±4,0	28±4,5	10±3,0	23±4,2
p	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	1,00	0,00	0,49	0,01	0,00	0,00	0,02	0,06
3-я	18±2,7	47±4,9	19±3,1	40±4,9	28±3,5	52±4,2	30±4,6	21±4,1	43±3,8	33±4,7	25±4,3	16±3,7	22±4,1
p	0,00	0,78	0,46	0,01	0,00	0,00	0,07	0,61	0,05	0,00	0,00	0,21	0,04
4-я	73±3,3	53±4,9	10±2,4	39±3,9	37±3,6	48±4,0	12±3,3	27±4,4	42±3,7	33±4,7	33±4,7	30±4,6	29±4,5
p	0,01	0,57	0,09	0,00	0,01	0,01	0,17	0,63	0,03	0,00	0,01	0,26	0,36

Примечание. Для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Выборочные параметры, приведенные в таблице, имеют следующие обозначения: средняя арифметическая (M), средняя ошибка средней арифметической (m), p — значимость различий между показателями контрольной и опытных групп.

В работе исследованы сульфатированные полисахариды из различных видов морских бурых водорослей. Выделение, изучение химического состава и структуры фукоиданов проведены в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН с применением современных методов исследования и любезно предоставлены нам д-ром хим. наук Т.Н. Звягинцевой:

1. Фукоидан из бурой водоросли *Laminaria japonica* является α-L-фуканом, сульфатированным в основном по C-4 остаткам фукозы (М.м. 10–30 кДа), отличается высоким содержанием галактозы. Моносахаридный состав представлен галактозой, маннозой, ксилозой и глюкозой в соотношении - 65:20:8:4:3;
2. Фукоидан из бурой водоросли *Laminaria cichorioides* представляет собой полностью сульфатированный 1→3-α-L-фукан (М.м. 40–80 кДа);
3. Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens* является 1→3;1→4-α-L-фуканом, сульфатированным в основном по C-2 остаткам фукозы (М.м. 40–60 кДа). Моносахаридный состав представлен галактозой, ксилозой и маннозой в соотношении 70:9:10:8. Соотношение фукозы и сульфата составляет 1:0,9.

Отрабатывали лечебно-профилактическую схему лечения животных. Под наблюдением находились следующие группы мышей (по 36 особей в каждой): 1-я группа (контроль) — мыши, зараженные внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл; 2-я группа — инфицированные мыши, которым за 5 дней до заражения и в течение 5 дней после заражения вводили препарат фукоидан из *L. japonica* внутримышечно по 100 мкг, что соответствует дозе 5 мг/кг; 3-я группа — инфицированные мыши, которым фукоидан из *L. cichorioides* введен по схеме 2-й группы; 4-я группа — инфицированные мыши, которым фукоидан из *F. evanescens* введен по схеме 2-й группы.

Наблюдение за животными вели 35 суток. Исследование перитонеальных макрофагов у зараженных мышей проводили через 30 мин, 1, 2, 4, 6, 24, 48 и 72 часа, 7, 10, 14, 21 и 35 суток. Макрофаги как объект

исследования выбраны в связи с тем, что при изучаемой инфекции они являются клетками-мишенями для вируса. Клетки экссудата собирали промыванием перитонеальной полости животных 5 мл среды 199, содержащей гепарин (5 ед./мл). Полученную клеточную взвесь центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об./мин и отмывали от гепарина 2 раза. Концентрацию клеток доводили до 5×10^6 кл./мл в среде 199. Взвесь клеток указанной концентрации наносили на покровные стекла и оставляли в термостате при 37°C на 30 мин для адгезии макрофагов и затем фиксировали в течение 40 с в холодном 96° этаноле.

Противовирусную активность полисахаридов оценивали с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител (нМФА) по их способности снижать процент инфицированных перитонеальных макрофагов. Постановку реакции осуществляли по стандартной методике с использованием иммунной сыворотки к вирусу Хантаан, полученной в результате заражения лабораторных 3–4-недельных крыс, и люминесцирующей сыворотки против глобулинов мыши (ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва).

В результате исследований установлено, что фукоиданы из бурых водорослей *L. japonica* и *L. cichorioides* обладают свойством подавлять инфекционность хантавируса в отношении перитонеальных макрофагов мышей преимущественно в начальную фазу инфекционного процесса. Так, полисахарид из *L. japonica* снижал через 30 мин после заражения число инфицированных клеток у животных в 5,7 раза, а через 1 час — в 1,9 раза по сравнению с контрольной группой (табл.). Фукоидан из бурой водоросли *L. cichorioides* проявлял менее выраженную защиту в первые 30 мин инфекционного процесса: количество зараженных клеток в препарате было снижено по сравнению с контролем в 3,2 раза. Через 2 часа после заражения происходило снижение показателя инфицированных макрофагов во всех группах, что может быть связано с распадом белковой оболочки вируса и высвобождением нуклеиновой кислоты [4]. В следующие 4–6

часов полисахарид из *L. japonica* снижал число инфицированных клеток у животных в среднем в 2,2 раза, а полисахарид из *L. cichorioides* — в 1,7 раза. Иная картина наблюдалась в группе зараженных хантавирусом мышей, получавших фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens*: защитный эффект у животных в первые 6 часов был мало выражен.

Дальнейшие исследования, проведенные в течение 1-й недели после заражения (24, 48 и 72 часа и 7 суток), показали, что количество инфицированных макрофагов в контрольных и опытных группах мышей практически не отличалось. В то же время положительный эффект фукоиданов из фукусовых и ламинариевых водорослей в той или иной степени был выявлен для каждого из испытанных препаратов на 10, 14 и 21-е сутки. Анализируя результаты исследований, следует отметить, что фукоидан из *L. japonica* оказывает наиболее выраженное защитное действие. Показатель инфицированных клеток при использовании этого полисахарида по сравнению с контролем на 10–21-й день снижался в среднем в 2,3 раза. При применении других сульфатированных полисахаридов различие в показателях пораженных вирусом макрофагов в опытах по сравнению с контролем было менее выражено. В отдаленные сроки экспериментальной хантавирусной инфекции (35-е сутки) показатели контроля и опыта в данной лечебно-профилактической схеме не различались.

В результате проведенных исследований установлено, что фукоиданы ламинариевых водорослей эффективно защищают мышей от хантавируса на начальном этапе развития инфекционного процесса. Снижение числа инфицированных перитонеальных макрофагов у животных в первые 30 мин и 1 час после заражения, возможно, связано со способностью фукоиданов из *L. japonica* и *L. cichorioides* блокировать проникновение вируса в клетки путем конкурентного взаимодействия с $\alpha\text{V}\beta 3$ -рецепторами ($\beta 3$ -интегрины). Однако, учитывая широкий спектр инфицированных тканей при ГЛПС и пантропизм возбудителя, резонно предположить, что наличие рецепторов — $\beta 3$ -интегринов — не всегда определяет чувствительность клетки к хантавирусу. Кроме этого в литературе имеются данные об использовании хантавирусами корецепторов для инфицирования клеток-мишеней [10]. Это наводит на мысль о том, что на клеточных мембранах, по-видимому, не существует специфичных, строго гомологичных и высокоаффинных рецепторов к белкам G1 и G2, способных реализовать проникновение вируса в клетки организма человека, и механизм вирусно-клеточного взаимодействия является многофакторным [9]. Подтверждением данного предположения служит также обнаружение двух частично перекрывающихся антигенных сайтов на белке G1 и семи — на белке G2 с различными функциональными свойствами [7]. Поэтому изучение важнейшего для раннего патогенеза хантавирусной инфекции вопроса о механизмах вирусно-клеточно-

го взаимодействия в первые часы инфекции является целью наших дальнейших исследований.

Несмотря на то, что сульфатированные полисахариды в той или иной степени подавляли первичное размножение хантавируса у инфицированных белых мышей, они не оказывали полного ингибирующего действия на инфекционный процесс. С течением времени вирус достигал оптимальной концентрации и показатель инфицированных макрофагов практически не отличался в опытных и контрольной группах. Высокая противовирусная активность препаратов в разгар инфекции (10–14-й день) связана, по-видимому, с их иммуномодулирующим действием. Полученные результаты позволяют, на наш взгляд, сделать предположение о том, что фукоиданы морских водорослей обладают способностью стимулировать напрямую или опосредованно (через продукцию цитокинов клетками) выработку специфических антител.

Патогенез хантавирусной инфекции включает в себя несколько стадий, начиная с участия клеток респираторного тракта в раннем иммунном ответе и заканчивая развитием полиорганной недостаточности, основой которой является вовлечение в инфекционный процесс обширной поверхности сосудистого эндотелия, клеток крови и тканевых макрофагов [1]. При этом инфицирование нового органа или ткани в начальный период болезни может быть следствием взаимодействия вируса с альтернативным клеточным рецептором. Данное направление исследований представляется перспективным в плане разработки новых подходов к процессу прерывания адсорбции вируса на чувствительных клетках.

Литература

1. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / Р.А. Слонова, Е.А. Ткаченко, В.А. Иванис и др. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2006.
2. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Ковальчук А.В. и др. // *Вопр. вирусол.* — 2006. — №2. — С. 34–36.
3. Макаренкова И.Д., Компанец Г.Г., Беседнова Н.Н. и др. // *Вопр. вирусол.* — 2007. — №2. — С. 29–32.
4. Соловьев В.Д., Баландин И.Г. *Клетка и вирус.* — М. : Медицина, 1973.
5. Усов А.И. // *Химия и технология растительных веществ : тез. докл. II Всерос. конф.* — Казань, 2002. — С. 91.
6. Фадеев Ф.А., Сергеев А.Г., Новоселов А.В. // *Вопр. вирусол.* — 2008. — № 1. — С. 4–9.
7. Arikava J., Yao J.S., Yoshimatsu K. et al. // *Arch. Virol.* — 1992. — Vol. 126, No. 1–4. — P. 271–281.
8. Gavrillovskaia I., Brown E., Ginsberg M. et al. // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73, No. 5. — P. 3951–3959.
9. Hall P.R., Hjelle B., Brown D.C. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2008. — [Epub ahead of print].
10. Krautkramer E., Zeier M. // *J. Virol.* — 2008. — Vol. 82, No. 9. — P. 4257–4264.

Поступила в редакцию 21.05.2008.

ANTIVIRAL ACTIVITY OF FUKOIDANS OF NATURAL ORIGIN AT THE EXPERIMENTAL INFECTION CAUSED BY HANTAVIRUS

I.G. Maksema, I.D. Makarenkova

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

Summary — The virus inhibiting activity of the fukoidans of the brown seaweed in view of their structural features in experiences in vivo at hantavirus infection at mice is investigated. It is found, that fukoidans from brown seaweed *Laminaria japonica* and

Laminaria cichorioides possess property to suppress the hantavirus infection to the peritoneal macrophages of mice mainly in an initial phase of infectious process. The positive effect of fukoidans from fukus and laminaria seaweed has been to some extent revealed for each of the tested preparations on 10, 14 and 21st day. High antiviral activity of preparations in peak of an infection (10–14th day) is connected, with their immune modulating action.

Key words: hantavirus infection, fukoidans, macrophage.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 86–89.

УДК 577.112:578.833.29

Н.Х. Мухаметханов¹, А.Х. Баймиев²

¹ Филиал НПО «Микроген» МЗ РФ «Иммунопрепарат», ² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА G2 ХАНТАВИРУСА СЕРОТИПА PUUMALA

Ключевые слова: вирус *Puumala*, гликопротеин G2, рекомбинантный белок.

От инфицированных мышевидных грызунов выделены и амплифицированы фрагменты М-сегмента, кодирующие оболочечный гликопротеин G2 хантавируса *Puumala*. Точные нуклеотидные последовательности гена определены и клонированы в экспрессирующий вектор Pin-Point. Некоторые антигенные характеристики рекомбинантного белка были установлены в ELISA.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — довольно распространенное заболевание на территории России. Различают два очага инфекции: на Дальнем Востоке и на территории Европейской части страны. Заболеваемость на территории Европейской части России в Республике Башкортостан занимает первое место, превышая показатели по стране в 8–15 раз, и составляет 40–60%. Этот очаг является одним из самых крупных и активных не только в России, но и в бывшем СССР [3]. Актуальность проблемы обусловлена отсутствием тенденции к снижению заболеваемости, тяжестью инфекционного процесса и количеством осложнений, что представляет большую опасность для трудоспособного населения. Кроме того, серьезную озабоченность вызывает то, что патологический процесс протекает в виде стертых, атипичных форм [5, 7]. Таким образом, в республике сложилась крайне напряженная эпидемиологическая ситуация, а следовательно, проблема разработки лечебных и профилактических средств является весьма актуальной [4].

В настоящее время проводятся исследования по созданию генно-инженерных конструкций, кодирующих поверхностные гликопротеины G1 и G2 вируса, относящегося к роду хантавирусов семейства буньявирусов [8, 10], которые в дальнейшем могут быть использованы как для получения тест-систем, так и ДНК-вакцины и вакцины на основе очищенных белков вируса [1, 6]. Геном отрицательной полярности включает три сегмента: большой (L), средний

(M) и малый (S). L-сегмент кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу с молекулярной массой 250 кДа, которая обладает также эндонуклеазной функцией и, возможно, рядом других [11]. М-сегмент кодирует два поверхностных гликопротеина G1 и G2 в виде одного предшественника с молекулярной массой 113–120 кДа, который посттрансляционно расщепляется и гликолизуется в эндоплазматическую сеть. Предполагается, что гликопротеины ответственны за присоединение и слияние с клеткой, а также за образование вируснейтрализующих антител [9, 12]. S-сегмент кодирует нуклеокапсидный белок с молекулярной массой 54 кДа. Данный белок выполняет как структурную функцию — связывается с РНК и гликопротеином G1, так и регуляторную — переключает трансляцию хантавируса на репликацию и наоборот [13].

От рыжих полевок, отловленных на территории Уфимского, Иглинского, Благовещенского и Туймазинского районов Республики Башкортостан, были отобраны образцы, которые в иммуноферментном анализе давали положительную реакцию на антигены хантавируса. Тотальная клеточная РНК была выделена из ткани легких зараженных грызунов массой 0,5 г с помощью гуанидинтиоцианатного метода. Ткань растирали тefлоновым пестиком в пробирке типа Эппендорф в буфере следующего состава: 4 М гуанидинтиоцианат, 2% саркозил. 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол. Далее добавляли 0,2 объема 10% додецилсульфата натрия, 0,1 объема 2М ацетата натрия (рН 4,0), 0,2 объема хлороформа и 1 объем фенола. Экстракцию проводили на шейкере в течение 1 часа. После депротеинизации вирионов смесью фенола (рН 5,0) и хлороформа РНК осаждали изопропанолом. Осадок РНК после двукратной промывки 70% этанолом растворяли в воде, обработанной диэтилпиروкарбонатом. Синтез

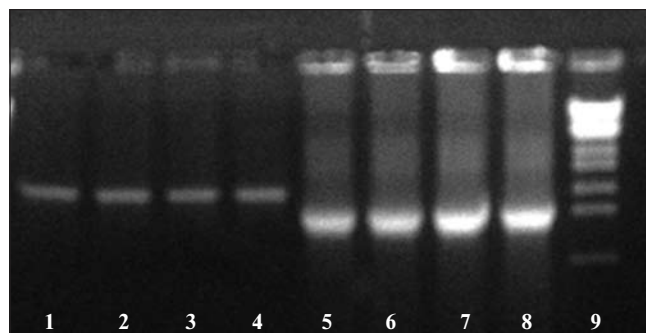


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов РНК хантавируса.

1–4 – продукты полимеразной цепной реакции при использовании внешних праймеров (1876 н.п.); 5–8 – продукты гнездовой полимеразной цепной реакции с использованием внешних и внутренних пар праймеров (1543 н.п.); 9 – маркер весов (ДНК фага λ , разрезанная рестриктазой *Bss*TI).

кДНК из выделенной РНК проводили с использованием коммерческого набора «Реверта» фирмы «Амписенс» согласно прилагаемой инструкции.

При синтезе кДНК был использован праймер с последовательностью – 5'-actccgcaagaagaagcaaacac-3'.

Аmplification гена выполняли методом гнездовой полимеразной цепной реакции на амплификаторе MC2 «Терцик» компании «ДНК-технология» (Россия) с использованием внешней и внутренней пары праймеров в два раунда в реакционной смеси объемом 30 мкл следующего состава: 60 мМ трис-НСl (рН 9,0), 25 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0,1% Тритон X-100, по 35 пкМ каждого праймера, 2 мМ dNTP, Taq полимеразы 1 ед., 7 мкг кДНК.

Первый раунд проводили при режиме амплификации: 94°C – 2 мин, далее 35 циклов 94°C – 40 с, 55,4°C – 1 мин, 72°C – 1 мин 50 с и 72°C – 2 мин. Для второго раунда был выбран режим: 94°C – 2 мин, 35 циклов 94°C – 40 с, 57°C – 1 мин, 72°C – 1 мин 30 с и 72°C – 2 мин.

Внешняя пара праймеров –

F1 5'-gtgatgctagctctggtgcgtgtatttggtt-3'

и R1 5'-agtagactccgcaagaacaaaag-3',

внутренняя пара –

F2 5'-aaaatttaaatgcaggt ggacag-3'

и R2 5'-ttagggccttatgtctcttctgtaactaggtct-3'.

Продукты амплификации анализировали в 1% агарозе с бромистым этидием. ПЦР продукт клонировали в специально приготовленный линейизованный вектор pBluescript II KS (–) с выступающими dT-концами.

При анализе рекомбинантных клонов для определения размера вставки использовали метод плазмидного профиля с быстрым щелочным лизисом бактериальных колоний *Escherichia coli*. Все вышеописанные процедуры, а также лигирование ДНК, приготовление компетентных клеток *E. coli* и трансформацию рекомбинантной ДНК проводили по стандартным процедурам, изложенным в лабораторном руководстве [2].

Определение нуклеотидных последовательностей выполняли на автоматическом секвенаторе ABI

PRISM 310 фирмы Applied Biosystems, Inc. (США) с помощью наборов Big Dye Terminator v. 3.1. Для сравнительного выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали пакет компьютерных программ Lasergene (США)

ПААГ-ДСН-электрофорез белка выполняли на приборе Protean II xi Cell (Bio-Rad, США) согласно прилагаемой методике с некоторыми изменениями. Концентрирующий гель использовали в концентрации 7%, а разделительный – 12,5%. Электрофорез длился 3–3,5 часа при постоянной силе тока 10 мА для концентрирующего геля и 20 мА для разделительного геля. Окрашивание проводили с использованием красителя «кумасси синий» 0,1% в 10% уксусной кислоте – 30 мин и отмывали в 5% уксусной кислоте в течение ночи.

Диализ осуществляли при 4°C в диализных мешочках против физиологического раствора в течение 10 часов. Осадок концентрировали и растворяли в буфере, содержащем 20 мМ фосфатный буфер рН 7,6, 2% тритон X-100 и 10% глицерин.

Из легких мышевидных грызунов была выделена полноразмерная РНК хантавируса и амплифицирован участок М-сегмента, соответствующий поверхностному гликопротеину G2. При амплификации гена применяли как ПЦР с одной парой праймеров, так и метод гнездовой ПЦР с двумя парами. Наилучший результат показал метод гнездовой ПЦР (рис. 1).

Очищенная амплифицированная ДНК была клонирована в плазмидный вектор pBluescript II KS (–) по EcoRV сайту. Для трансформации использовали штамм JM 109 *E. coli*. Скрининг рекомбинантных клонов проводили с помощью плазмидного профиля и полимеразной цепной реакции.

Колонии *E. coli*, содержащие плазмиды со вставками, были отобраны для проверки последовательностей клонированного ПЦР-продукта. Определение нуклеотидной последовательности синтезированного продукта показало, что в нескольких пробах имеются вставки с полноразмерным геном G2.

При сравнении секвенированного нами гена гликопротеина G2 (EU069361) длиной 1543 нуклеотидных пар с аналогичным геном ранее выделенного на территории РБ штамма CG 1820 хантавируса серотипа PUU были выявлены следующие отличия: в положении 1990 была обнаружена замена С→G, в положении 1997 – G→A, 2063 – A→G, 2109 – A→C, 2143 – A→G, 2215 – G→A, 2443 – A→G, 2602 – C→T, 2724 – C→G, 2763 – C→T, 2781 – A→T, 2829 – A→G, 2837 – T→C, 2863 – C→T, 2866 – T→C, 2893 – T→C, 2896 – A→G, 3269–3270 – CC→GG. Большинство нуклеотидных замен попадали на вырожденные нуклеотиды кодонов и не приводили к замене аминокислот за некоторым исключением. Замена в положении 2063 приводит к замене R→G, в положении 2109 – к Q→P, 2724 – к P→R, 2763 – к A→V, 2781 – к Q→L, 2829 – к K→R, 2837 – к F→L, 3269 – к P→G.

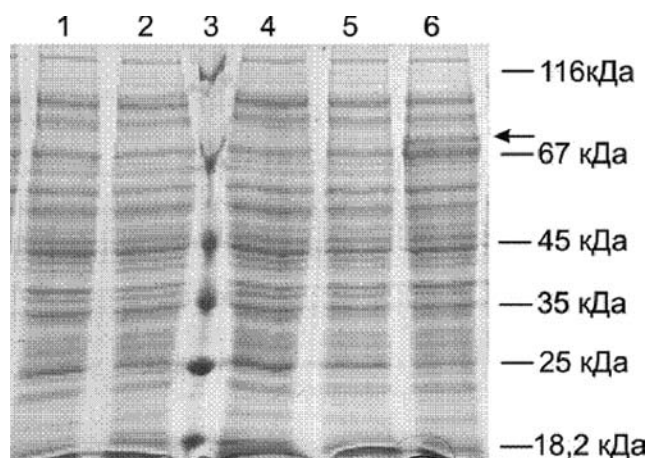


Рис. 2. ПААГ-ДСН-гель-электрофорез белков.

1, 2 – образцы до индукции; 3 – маркеры весов белка: 116, 66,2, 45, 35, 25 и 18,2 кДа соответственно; 4–6 – клоны после индукции (стрелкой отмечена полоса, соответствующая белку G2).

Для наработки целевого белка ген G2 из вектора pBluescript II KS (–) был переклонирован в специализированный для этих целей вектор PinPoint (Promega). Полученная конструкция была трансформирована в клетки *E. coli* (штамм JM 109). Культивирование клеток для наработки целевого белка проводили в условиях индукции на среде LB объемом 500 мл в течение 4,5 часа. Клетки, охлажденные до 4°C, осаждали, ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 8,0) с 8М мочевиной. Для защиты белка от разрушения использовали ингибитор протеаз (фенилметилсульфанилфторид). Клетки лизировали ультразвуковым дезинтегратором при частоте 20 кГц. Воздействие ультразвуком проводили в ледяной бане по 15 секунд с 30-секундными интервалами, чтобы избежать локального перегрева образца. Нарботку целевого белка анализировали с помощью ПААГ-ДСН-гель-электрофореза. Таким образом были определены и отобраны для дальнейшего исследования клоны, нарабатывающие целевой белок. Необходимо отметить, что он, по неизвестным для нас причинам, нарабатывался не во всех клонках, если даже плазмида *E. coli* содержала необходимую вставку в рамке считывания в нужной ориентации (рис. 2).

Для определения наличия антигенных детерминант рекомбинантного белка G2 был проведен иммуноферментный анализ для выявления антигенов хантавирусов с использованием тест-системы «Хантагност», разработанной ГУП по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН (г. Москва), согласно рекомендациям производителя.

Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометрическом оборудовании «Унискан» при длине волны 492 нм. Для данной тест-системы положительными считаются пробы, оптическая плотность которых в лунках с антихантавирусным IgG превосходит оптическую плотность лунок с нормальным IgG в 2,1 и более раз. По результатам изме-

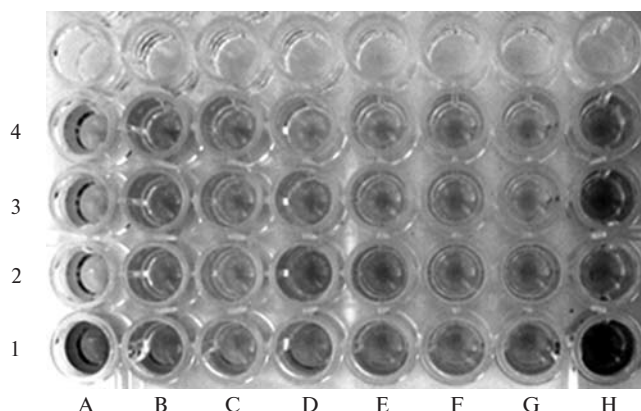


Рис. 3. Иммуноферментный анализ рекомбинантного белка G2 вируса Пуумала.

Нечетные ряды – антихантавирусный иммуноглобулин G, четные – нормальный иммуноглобулин G человека, лунка H3 – контроль с вирусным антигеном.

Таблица

Иммуноферментный анализ рекомбинантного белка G2 вируса *Puumala*

	1	2	3	4
A	1,923	0,308	0,273	0,277
B	0,445	0,422	0,362	0,370
C	0,300	0,291	0,289	0,294
D	0,587	0,643	0,416	0,310
E	0,523	0,608	0,347	0,326
F	0,374	0,368	0,355	0,313
G	0,402	0,382	0,212	0,267
H	2,303	0,498	1,316	0,511

Примечание: ряды 1, 3 – антихантавирусный иммуноглобулин G, ряды 2, 4 – нормальный иммуноглобулин G человека, H3 – контроль антигена хантавируса.

рения оптической плотности положительными являются образцы, соответствующие лункам A1 и H1, разница оптической плотности в которых соответственно равна 6,24 и 4,62. Остальные образцы показали отрицательный результат (рис. 3, табл.).

Таким образом, был получен штамм *E. coli*, продуцирующий белок G2 вируса *Puumala*, и выявлено наличие определенных антигенных детерминантов у данного рекомбинантного белка, экспрессирующегося в прокариотической системе.

Литература

1. Дебабов В.Г. // Молекулярная биология. – 1997. – Т. 31. – С. 209–215.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984.
3. Магазов Р.Ш., Кулагин В.Ф., Хайбуллина С.Ф. // Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом – пути решения проблемы. – Уфа, 1995. – С. 5–9.
4. Никоноров Ю. М., Хасанова С.С., Филатова О.В. и др. // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2001. – № 1. – С. 35–39.

5. Нургалеева Р.Г., Ткаченко Е.А., Степаненко А.Г. и др. // Журн. микробиол. — 1999. — № 6. — С. 45–49.
6. Спасокукоцкий А. // Аптека. — 2000. — № 229. — С. 1.
7. Фазлыева Р.М., Хунафина Д.Х., Камилов Ф.Х. // Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в республике Башкортостан. — Уфа, 1995.
8. Филдс Б.Н., Найн Д.М., Мэрфи Ф.А. и др. Вирусология. — М.: Мир, 1989.
9. Alexeyev O., Elgh F., Zhestkov A. et al. // Lancet. — 1996. — Vol. 347. — P. 1483.
10. Antic D., Lim B.U., Kang C. Y. // Virus Res. — 1991. — Vol. 19. — P. 47–58.
11. Antic D., Lim B.U., Kang C.Y. // Virus Res. — 1991. — Vol. 19. — P. 59–66.
12. Antic D., Wright K.E., Kang C.Y. // Virology. — 1992. — Vol. 189. — P. 324–328.
13. Antic D., Yong Kang C., Kristin S. et al. // Virus Res. — 1992. — Vol. 24. — P. 35–46.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

OBTAINING OF RECOMBINANT PROTEIN G2 OF HANTAVIRUS SEROTYPE PUUMALA

N.Kh. Muhametkhanov¹, An.H. Baymiev²

¹ Immunopreparat, an Ufa branch of Microgen State Company,

² Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Centre of Russian Academy of Sciences

Summary — From the infected mice the area of M-segment coding superficial glycoprotein G2 of hantavirus serotype Puumala was allocated and amplified. Certain nucleotide sequence of a gene was defined and cloned in the expression vector Pin-Point. ELISA reveals the certain antigenic properties of the recombinant protein.

Key words: virus Puumala, glycoprotein G2, recombinant protein.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 89–92.

УДК 372.82(510)

Чжан Лили, Ли Ливэй

Харбинский медицинский университет (КНР)

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ В ОБУЧЕНИИ РУССКОМУ ЯЗЫКУ В КИТАЕ

Ключевые слова: русский язык, китайская аудитория, вопросы преподавания.

Изложен опыт преподавания русского языка китайской аудитории. Подчеркивается важность знания лексико-семантических особенностей изучаемого языка и этапности обучения. На начальном этапе обучения лексико-семантические группы включают стилистически нейтральную и активную лексику. В дальнейшем изучается пассивная лексика, словообразовательные связи, совершенствуются речевые навыки. На всех этапах обучения, независимо от его характера и содержания, необходимо опираться на лексико-семантическую систему русского языка, что позволяет овладеть говорением и слушанием, чтением и письмом.

Лексическая работа подчиняется главной цели — овладению всеми видами речевой деятельности — говорением, слушанием, чтением, письмом. Работа над словом присутствует на всех этапах обучения русскому языку: от момента восприятия новых слов до активного употребления слова в устной и письменной речи. В методике преподавания иностранного языка, в т.ч. русского, большое внимание уделяется приемам работы с лексическим материалом [2, 4].

При изучении иностранных языков полезно установить связь между изучаемым языком и родным. Опыт преподавания русского языка в китайской аудитории показывает, что лексическая система, семантика русского слова представляют для студентов большие трудности. Во-первых, при определении семантики приходится опираться на окружающую действительность, на наше представление о ней. А она в КНР и в России разная. Во-вторых, необходимо учитывать весь спектр лексических значений русского языка, а это тоже нелегко. Приходится констатировать, что лексический уровень русского языка имеет сложную организацию, свои закономерности. Без учета этого

невозможно сформировать у обучаемых правильные лексические и речевые навыки, правильное мировосприятие изучаемого языка и его носителя.

Формирование лингвистических навыков тесно связано с упражнениями, которые должны опираться на лексико-семантические особенности изучаемого языка. Лексика русского языка представляет собой своеобразную систему: слова, выражения с их грамматическими и словообразовательными характеристиками объединяются в этой системе в группы и вступают между собой в определенные смысловые отношения. Это так называемые лексико-семантические группы (ЛСГ). ЛСГ влияют на связь значения слов, на основные правила их сочетания [3].

ЛСГ группы объединяют синонимы, антонимы, многоязычные слова и т.д. Поэтому в практике преподавания русского языка мы опираемся на понятие «учебная ЛСГ». Это группа, состав слов которой определяется потребностями обучения, зависит от этапа обучения и отобранного текстового материала. На начальном этапе обучения в учебную ЛСГ включается только стилистически нейтральная и активная лексика.

На продвинутом этапе обучения в ЛСГ отбирается стилистически и эмоционально-экспрессивно окрашенная лексика. Большинство учебников русского языка для иностранцев основаны именно на таком подходе. Например, имена прилагательные объединяются в группы со значением размера, цвета (маленький, небольшой, крохотный, кумачовый, алый), глаголы — в группы со значением передвижения (идти, тащиться) речемыслительной деятельности (говорить, шептать; думать, размышлять), волеизъявления (хотеть, желать, стремиться) и т.п.

Отбор слов в учебную ЛСГ обычно проводится на базе прямого, основного, значения. Производные и переносные значения слов учитываются в большей степени на продвинутом этапе обучения. Лексический минимум русского языка для иностранных учащихся отражается в специальных словарях [1, 4].

Кроме отбора слов в ЛСГ, большую роль играет упорядочение лексического минимума. Оно связано в первую очередь с учетом конкретных целей обучения различным видам речевой деятельности — говорению, аудированию, чтению и письму. Каждый из них требует упорядочения лексики, но с учетом разных факторов. Например, чтение допускает равновесие активной и пассивной лексики, т.к. недостающие сведения можно получить в справочниках и словарях, которыми снабжены адаптированные тексты. Говорение предполагает активное воспроизведение накопленного словарного запаса. Пассивные лексические единицы требуют разъяснения и поэтому «мешают» в процессе говорения. Таким образом, упорядочение лексического минимума должно опираться на принадлежность слов к активному или пассивному словарю.

В активном словаре единицы, как правило, представлены в синонимических и антонимических парах: добрый — злой, красивый — некрасивый, высокий — низкий (о человеке) и т.д. Сравните, например, типичные задания в учебниках: «Запомните антонимические пары прилагательных, обозначающих оценку характера и поведения человека (вежливый — грубый, добрый — злой, нежный — грубый, трудолюбивый — ленивый, серьезный — легкомысленный, замкнутый — общительный и т.д.). Или прочтите в русском толковом словаре словарные статьи глаголов: овладеть, освоить, усвоить; выясните их смысловую разницу и употребление. Запомните данные ниже словосочетания с этими глаголами:

- освоить/осваивать — машину, оборудование, технику, технологию, передовой метод, мастерство, профессию, теорию, проектную мощность, электричество;
- усвоить/усваивать — знания, грамматические правила, азбуку, таблицу умножения, виды глагола, навыки».

Таким образом, при работе с учебной лексикой проявляется принцип системности, опирающийся на парадигматические отношения русского языка. Парадигматические отношения в лексике представлены во всех учебниках русского языка для китайских студентов-русистов [1].

Большое значение для упорядочения лексического материала имеют словообразовательные связи слов [2]. Этот тип отношений очень важен для русского языка. Он способствует формированию у студентов, изучающих русский язык, устойчивых ассоциативных связей между «родственными» словами. Это родство ощущается не только благодаря общности, близости значений ассоциируемых слов, но и благодаря особым словообразовательным формам — аффиксам. Умение находить в тексте, распознавать по формальным признакам имена существительные,

прилагательные, местоимения, а следовательно, сопоставлять слова разных частей речи, находить общие и отличающие их элементы структуры слова — все это требует понимания и овладения элементами словообразовательной системы русского языка.

Словообразовательные связи позволяют упорядочить слова в учебной ЛСГ с точки зрения регулярных словообразовательных значений и объединить однокоренные слова, значения которых во многом определяются корнем. Так, при изучении лексико-семантической группы «профессия — специальность», студентам предлагается ряд заданий, учитывающих словообразовательные связи слов. Например, «Посмотрите таблицу, демонстрирующую словообразование существительных, называющих людей по роду деятельности или занятию. Скажите, от каких слов образуются эти существительные, при помощи каких суффиксов. Назовите наиболее продуктивные словообразовательные типы». Или: «От следующих глаголов образуйте существительные со значением лица, характеризующегося названным действием:

- а) -тель: испытать, изобретать, слушать, учить;
- б) -ник: шутить, путешествовать;
- в) -чик/щик: грузить, разносить, проектировать и т.д.».

Упорядочить лексический материал позволяют знания об употреблении слов в предложении, в определенных языковых моделях и синтаксических функциях. Упорядочение словарного материала в учебной ЛСГ опирается на синтаксические характеристики слов. Сравним, например, учет синтаксической характеристики слов в учебной ЛСГ «зарплата, заработная плата, получка, ставка». «Прочитайте текст и словосочетания... Зарплата: месячная, высокая, большая, низкая, маленькая; выписать, выдать, получить, повысить, понизить (снизить) зарплату; перевести зарплату на сберкнижку (в сберкасса), вычесть (какую-то сумму) из зарплаты, налог с зарплаты; день зарплаты; сегодня зарплата и т.д.».

Таким образом, упорядочение лексического материала в учебной ЛСГ целесообразно с точки зрения активности-пассивности, основных аспектов системной организации лексики русского языка — парадигматики, синтагматики, деривации.

Лексические навыки тесно связаны с системой языковых и речевых упражнений. Языковые или собственно лексические упражнения связаны с парадигматическими и синтагматическими способами семантизации лексики [2]. Они позволяют выявить логические отношения, существующие в лексико-семантической системе русского языка. В основном это тренировочные упражнения на выбор или подбор слов, на различение слов в списках, микроконтекстах. Они нацелены на формирование у обучающихся устойчивых лексических ассоциаций.

Наиболее активным видом речевой деятельности являются упражнения другого рода. Например, упражнение с заданием построить высказывание по другой модели с использованием данной лексики, построить

текст (монологически развернутое высказывание) на заданную тему с использованием опорной лексики. Сравним, например: «при описании внешности и характера кого-либо употребляется конструкция «у кого что». У него хороший характер. Составьте как можно больше предложений, употребляя конструкцию «у кого что». Слова для справок: глаза — карие, черные, голубые, большие, веселые; лицо — широкое, узкое, бледное, румяное, смуглое; волосы — русые, черные, седые, густые, прямые, кудрявые...».

В практике преподавания возникают трудности, обусловленные факторами взаимодействия лексических систем русского языка и родного языка обучающихся. У лексических систем русского и китайского языков очень мало точек соприкосновения [2, 3]. Например, в каждом из них много лексики, не имеющей однословных соответствий. Лексика, называющая предметы и явления, характерная для русских, имеет национально-специфический характер.

Более типичны другие случаи. В русском и китайском языках часто не совпадают семантический объем и структура многозначных слов, объем отдельных значений. Отсутствие взаимно-однозначного соответствия между словами сравниваемых языков создает дополнительные трудности в освоении лексики русского языка. Безэквивалентная лексика русского языка обычно привлекает внимание обучающихся, особенно если предмет, названный словом, легко представить себе наглядно. Поэтому она усваивается. С многозначными словами, семантические объемы которых не совпадают, гораздо сложнее.

Сложность для понимания и усвоения составляют слова, близкие по значению, синонимы. Они особенно сложны, поскольку различия в оттенках их значений и сочетаемости осознаются только в языковой практике, в процессе формирования мировосприятия через русский язык и на русском языке. Так, очень сложно применять на практике семантические, стилистические, оценочные различия в значениях «возрастные рамки» в ряду существительных типа: девочка — девчонка — девчушка — девушка — девица — деваха; бабушка — бабулька — бабуленька — бабка — баба; старуха — старушка — старушечка и т.д.

Трудны для овладения также сложные и сложносокращенные слова. Как правило, они не воспринимаются студентами как состоящие из частей уже знакомых им слов. Поэтому в данном случае важны такие упражнения, которые помогают вычленять составляющие части, определять значения слов, основные модели словосложения. Например: «Прочитайте сложные прилагательные. Укажите, от каких слов они образованы и к какому типу они относятся. Переведите их на китайский язык: научно-исследовательский, биохимический, бело-розовый и т.д.». Или: «Образуйте сложные прилагательные от следующих словосочетаний: широкие плечи, сельское хозяйство, черные волосы, Южная Америка и т.д.». Или: «Определите, по какой модели образова-

ны сложные слова: ледоход, водопровод, землетрясение; трехэтажный, десятикратный, одноместный...».

Благодаря таким упражнениям у студентов формируется навык словообразовательного анализа и пополняется лексический запас.

При изучении лексики необходимо научить пользоваться словарем. На ранних этапах обучения это может быть одноязычный толковый словарь, на продвинутом этапе — специальные словари, с помощью которых можно подготовить упражнения с антонимами и синонимами, на различение архаизмов, неологизмов и лексики основного словарного фонда, просторечных и диалектных слов, слов с различной стилистической и эмоционально-экспрессивной окраской. При подборе лексического материала и разработке упражнений необходимо обращать внимание и на эти аспекты, связанные со стилистической дифференциацией русской лексики. Это важно. Но все-таки главной в работе является лексика основного фонда, т.е. «кодифицированная» лексика, являющаяся стилистически нейтральной. Именно она позволяет овладеть говорением и слушанием, чтением и письмом на русском языке.

На всех этапах обучения, независимо от характера и содержания текста, необходимо опираться на лексико-семантическую систему русского языка при отборе приемов работы, обусловленных спецификой самого материала. Все это создает условия для дальнейшего продвижения обучающихся в изучении русского языка, его культуры, народа.

Литература

1. Денисов П.Н., Морковкин В.В. *Словарь сочетаемости русского языка*. 2-е изд. — М.: Русский язык, 1983.
2. Костомаров В.Г., Митрофанова О.Д. *Методическое руководство для преподавателей русского языка иностранцам*. — М.: Русский язык, 1978.
3. Морковкин В.В. *Лексическая основа русского языка*. — М.: Русский язык, 1984.
4. *Русский язык для студентов-русистов филологических факультетов вузов Китая / Дин Шуци, Н.Н. Римская-Корсакова и др. — Ч. 1—8. — Пекин: Пекинский ун-т ин. яз; Ин-т русского языка им. А.С. Пушкина, 1994—1997.*

Поступила в редакцию 05.12.2007.

METHODICAL TACTICS IN TRAINING RUSSIAN IN CHINA

Zhan Lili, Li Liway

Harbin medical university (Chinese People's Republic)

Summary — Experience of teaching of Russian to the Chinese audience is stated. Importance of knowledge of lexicon and semantic features of investigated language and staging training is emphasized. At the initial stage of training semantic groups include neutral style and active lexicon. Further the passive lexicon, word-formation communications is studied, speech skills are improved. At all grade levels, irrespective of its character and the contents, it is necessary to base on lexicon and semantic system of Russian that allows learning speaking and hearing, reading and writing.

Key words: Russian, Chinese audience, teaching.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 92—94.

УДК 001.89:061.6

Д.В. Черток¹, В.М. Черток²

¹Дальневосточный государственный университет (г. Владивосток), ²Владивостокский государственный медицинский университет

ПАРКИ И ИХ РОЛЬ В СОЗДАНИИ ИННОВАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ВУЗОВСКОЙ НАУКИ

Ключевые слова: научные и технопарки, инновации, организация вузовской науки.

В работе рассмотрены некоторые вопросы организации научных и технопарков — важнейших элементов современной рыночной системы, организационной формы сращивания высших учебных заведений, консультационных и инновационных фирм, промышленных предприятий. Поскольку во Владивостоке существуют все условия для создания парков, ведущие вузы города могли бы стать инициаторами в решении этой проблемы, что способствовало бы увеличению инновационного потенциала вузовской науки.

Экономический прогресс современного общества обеспечивается в основном на базе инноваций, т.е. превращения потенциального научно-технического прогресса в реальный, воплощающийся в новых продуктах и технологиях. Инновации являются результатом соединения возможностей научно-технического прогресса с экономическими потребностями. Опыт многих стран свидетельствует, что без привлечения дополнительных ресурсов инновационный процесс может осуществляться только в результате более полного использования имеющегося экономического и научного потенциала [2, 4, 5].

Приемлемой формой для реализации этого процесса являются любые структуры, апробированные мировой практикой и позволяющие сконцентрировать финансовые и материальные ресурсы на инновационном развитии. Экономическим инструментом ускорения научно-технического прогресса в большинстве стран являются различные виды парков [1, 6].

Парки — важнейший элемент современной рыночной системы, организационная форма сращивания высших учебных заведений, консультационных и инновационных фирм, инновационных компаний и других предприятий. В зависимости от характера и объема выполняемых функций существуют следующие разновидности парков:

1. Научные (или исследовательские) парки, которые обслуживают как новые, так и вполне зрелые предприятия, поддерживающие тесные связи или действующие совместно с университетами или научно-исследовательскими институтами;

2. Технологические парки — научно-промышленные комплексы, в которых осуществляется сотрудничество, обмен идеями и информацией между предприятиями, университетами и научными организациями в целях внедрения нововведений и получения прибыли. У технопарков имеется в распоряжении целая сеть наукоемких фирм и производств;

3. Инновационные центры, оказывающие содействие преимущественно новым фирмам, связанным с наукоемкими технологиями.

Научный парк представляет собой научно-производственный территориальный комплекс, включающий исследовательский центр и прилегающую к нему компактную производственную зону, в которой размещаются малые наукоемкие фирмы. Это форма сотрудничества промышленных фирм с университетами. Промышленные компании создают близ университетов свои научно-исследовательские организации и предприятия, которые привлекают для работы над заказами фирм персонал университетов. В свою очередь научные работники имеют возможность практически применять результаты своих исследований.

В более широком смысле слова научный парк — это центр по разработке и производству наукоемкой продукции. В основе научных парков лежат четыре принципа:

- 1) создание максимально благоприятных условий для наукоемкого производства, инноваций;
- 2) максимальное сближение, в том числе и территориальное, науки, производства и коммерции;
- 3) объединение фирм, которые разрабатывают различные виды наукоемкой продукции, позволяющие создать условия для продуктивного обмена идеями и опытом;
- 4) создание для развития идей благоприятных условий для их выживания на рынке.

Формирование парка осуществляется на экономической основе в условиях равноправного партнерства всех входящих в него звеньев (вузы, НИИ, производство). Каждый из партнеров может извлечь максимум преимуществ от такой интеграции. Вузы и научно-исследовательские институты, функционируя в условиях инновационной зоны, могут осуществлять учебный процесс, научные исследования непосредственно на технически, технологически и организационно передовом производстве, отрабатывая результаты исследований на реальном объекте для последующего их распределения на других предприятиях.

Студенты и аспиранты, преподаватели университетов, осваивая новую технику, технологию, организацию производства в реальных условиях могут выполнять функции инноваторов по отношению к другим предприятиям. Кроме того, они одновременно будут приобретать на инновационном предприятии

навыки научного или инновационного менеджмента. С высоким профессиональным кадровым сопровождением производство имеет возможность получать постоянный приток инновационных идей и проектов.

В большинстве стран основную часть финансирования научные парки получают от государства (в Германии — 78%, во Франции — 74%, в Бельгии — почти 100%). Государственная помощь выступает в различных формах. В Японии, например, целый ряд государственных фондов, банков и корпораций предоставляют фирмам, разрабатывающим наукоемкую продукцию, кредиты на длительный срок и под льготные проценты [1, 2]. В большинстве западных стран регионы отчаянно конкурируют друг с другом, стремясь создать либо завлечь к себе как можно больше предприятий, научных центров — как национальных, так и зарубежных. Подчас кредит и проценты требуется выплачивать лишь в тех случаях, когда исследования заканчиваются успешно, а в случае неудачи деньги можно вообще не возвращать.

Технологический парк — одна из наиболее распространенных в США и Западной Европе форм функционирования разработчиков новых технологий. В качестве образца технологического парка во многих странах принята модель научно-производственного центра, созданного на базе Стэнфордского университета в Калифорнии. Этот технологический парк сосредоточивает около 3 тыс. средних и мелких электронных фирм с общим числом занятых 190–200 тыс. человек. В ФРГ технопарки включают 10–30 мелких предприятий, размещенных на единой территории. В качестве важного условия предусматривается создание технопарков в непосредственной близости от университетов. Предпочтение отдается недавно созданным предприятиям, специализирующимся в таких перспективных областях, как микроэлектроника, медицинская техника, фармацевтические препараты и др. Устанавливается тесная кооперация с отделами фундаментальных и прикладных исследований вузов, исследовательских институтов, в результате которых создаются и доводятся до стадий практического использования новые товары или технологии. В качестве организаторов технопарков часто выступают сотрудники университетских и научно-исследовательских центров, стремящихся коммерциализировать результаты собственных научных разработок (в ряде технопарков эта категория предпринимателей составляет более 50%).

В результате повышенного внимания и хорошего финансирования парков многие регионы из отсталых быстро преобразились в процветающие. Например, в первых четырнадцати технопарках Японии было создано более двух тысяч высокотехнологичных предприятий по производству фармацевтических препаратов, средств связи, вычислительной техники, электронных приборов и компонентов, медицинского оборудования, оптических инструментов, т.е. всего

того, что символизирует научно-технический прогресс.

С начала 80-х годов XX века в западно-европейских странах получила распространение новая для этих стран разновидность парков, ориентированная на нужды мелких высокотехнологичных предприятий, — инновационные центры. Их задача — соединять идеи и изобретения с капиталом и предпринимателями, привлекать общественные и частные фонды, чтобы обеспечить «стартовый период» новым внедренческим компаниям [3, 4].

Функции центров охватывают различные стадии инновационного процесса, в особенности стимулирование перехода от экспериментального производства к коммерческому освоению новой продукции. Часто инновационные центры оказывают исследователям-предпринимателям помощь в продаже лицензии на новый продукт уже действующим производителям. Ряд центров находится в ведении местных властей, а более крупные входят в Европейскую сеть, которая объединяет около 40 инновационных центров.

А что же в России? Переход к рынку обнажил недостатки российской экономики, и прежде всего ее научно-промышленного комплекса. Главная проблема состояла в том, что новая техника у нас всегда стоила дороже, чем низкоквалифицированная рабочая сила, и дорожала значительно быстрее. В условиях инфляции цены на новую технику растут значительно быстрее, чем производительность этой техники, что вызывает неуклонное снижение экономического эффекта от ее применения. При таком положении дел модернизация становится невыгодной, поскольку предприятия, не использующие достижения научно-технического прогресса, имеют более низкие издержки и, следовательно, лучшие индивидуальные условия производства. Малопродуктивный, но нищенски оплачиваемый труд успешно конкурирует с передовой техникой [2, 5]. Именно необходимость замещать машины живым трудом стала основной причиной падения рыночного спроса предприятий на новейшие наукоемкие средства производства.

К этому надо добавить резкое снижение объемов финансирования научных исследований со стороны государства и «утечку мозгов» за границу. По оценкам экспертов ежегодный ущерб от этого явления составляет 50–60 млрд долларов [3, 4]. Огромный ущерб был нанесен вузовской науке. При полном отсутствии государственного финансирования научные исследования в абсолютном большинстве вузов легли на плечи самих исполнителей — аспирантов, ординаторов, молодых преподавателей — одной из наиболее творчески активной и наименее материально обеспеченной категорий населения страны. Это привело, прежде всего, к стремительному снижению качества исследований, сокращению притока молодых кадров в науку. Таким образом разрушался научный потенциал России.

- Кафедра анатомии ВГМУ
- ТИБОХ ДВО РАН
- Институт биологии моря ДВО РАН
- Институт биофизики РАН (г. Пушкино)
- Институт лазерной хирургии РАМН (г. Москва)

- Тихоокеанский военно-морской госпиталь
- Кафедра военно-морской терапии ВГМУ

- Пароходство
- Рыбопромышленные суда
- Военно-морской флот

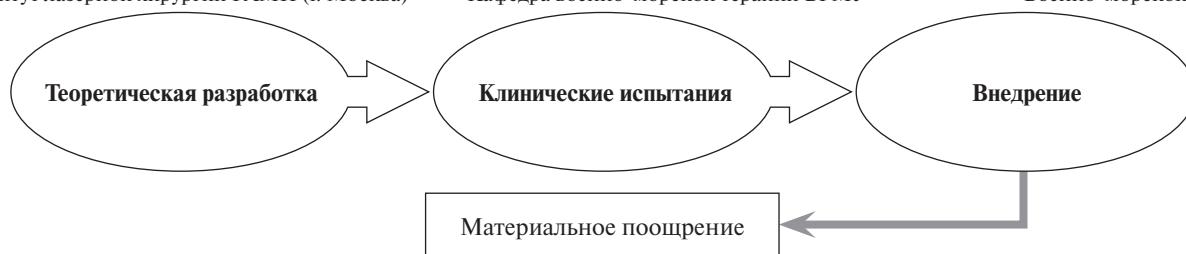


Рис. Схема формирования научно-производственной цепи, свойственной технопарку.

В таких условиях спасением вузовской, да и не только вузовской, науки могли бы стать различные виды парков, созданные на базе учебных и научно-исследовательских институтов и поддерживающие тесные контакты с промышленностью. И тому есть в России хотя и немногочисленные, но положительные примеры.

В 1990 г. в Томске был создан первый российский технопарк. Организованный как ассоциация государственных учреждений со 100% государственной собственностью (его учредителями стали Минвуз России, властные структуры региона, ведущие вузы города, Томский научный центр СО РАН и промышленные крупные предприятия), позже он был реформирован в акционерное общество (акционеры — ведущие ученые, преподаватели вузов и инженеры). А в конце 1996 г. в России функционировало уже 56 научных парков, созданных в 40 городах страны на базе вузов, в составе которых насчитывалось 780 малых инновационных фирм и около 10 тыс. человек. Объем инновационной деятельности оценивался в 32 млрд рублей, в том числе 6,5 млрд приходилось на внешнеэкономические операции [4, 6].

Первым отечественным парком, созданным на основе университета, стал технопарк МГУ, объединяющий более 30 фирм и около 500 сотрудников. Его появление в немалой степени связано с тем, что в лабораториях МГУ было накоплено немало научных идей, которые могли быть коммерциализированы. Научный парк МГУ довольно молод — большинству его сотрудников меньше 40 лет, но эффективно работает. Впрочем, молодость — характерное свойство отечественных и зарубежных парков. Основные направления их деятельности — информационно-компьютерные технологии, оптическая и лазерная техника, биотехнология и экологический мониторинг.

В настоящее время проекты технологических парков разрабатываются в Ростове-на-Дону, Нижнем Новгороде, Челябинске, Троицке, Екатеринбурге.

В России имеется определенный опыт и в создании инновационных центров, где они функционируют на базе технополисов и парков. Разрабатываемая ими продукция весьма разнообразна — очистные сооружения, медицинское оборудование, создание

фармакологических препаратов, компьютерные программы для высшей школы и многое другое [2].

В этой сфере совместной деятельности науки и производства есть и немалые проблемы, главными из которых являются: отсутствие надежной правовой базы создания парков, недостаточность материально-технической и финансовой поддержки со стороны государства и, конечно, отсутствие квалифицированных кадров [1, 3]. Отечественным паркам в отличие от зарубежных приходится существовать преимущественно за счет самофинансирования. Его основными источниками являются реализация на рынке своей продукции. Еще одно принципиальное отличие состоит в том, что за рубежом технополисы и парки имеют большие налоговые льготы, у нас же они считаются обычными коммерческими структурами со всеми вытекающими отсюда последствиями. Зато при распределении кредитов они рассматриваются как некоммерческие и, соответственно, неприбыльные организации. Поэтому научному парку, например, получить кредит, в том числе и в государственном банке, практически невозможно. И тем не менее преимущества создания таких центров для скорейшего формирования инновационного потенциала вузовской науки неоспоримы.

Во Владивостоке существуют все условия для создания научных и технопарков, инновационных центров, хотя, насколько нам известно, юридически оформленных и эффективно работающих научно-производственных объединений такого плана пока нет. Наши вузы могли бы стать первыми в решении этой проблемы. Медицинский университет, к примеру, обладающий высоким научным потенциалом, давно и эффективно сотрудничает с научными институтами ДВО РАН и РАМН, лечебно-профилактическими учреждениями Приморья и Дальнего Востока. Ведущие ученые и авторитетные кафедры вуза могли бы стать инициаторами в организации этого процесса.

Первые практические шаги по формированию научно-производственной цепи, свойственной технопарку, предприняты кафедрой анатомии человека Владивостокского медицинского университета: теоретическая разработка — клиническое испытание — внедрение — материальное поощрение (рис.). И хотя уже в

самом начале реализации этой программы ее участники столкнулись со всеми указанными выше проблемами формирования парков, что свидетельствует об их системном характере, тем не менее нашлись законные способы преодоления возникших трудностей. Поступательное движение вперед продолжается.

В заключение отметим, что формирование цивилизованного рынка предполагает развитие тех секторов экономики, которые приносят обществу пользу, а не истощают его сырьевые ресурсы и подрывают нравственные устои. Поэтому развитие отечественных парков необходимо не только для адаптации науки к рынку, но и для придания отечественному рынку цивилизованного вида. Не вызывает сомнений, что научные и технопарки, ориентированные в своей деятельности на инновационную модель, позволят сберечь и модернизировать отечественную науку, поднять ее до уровня конкурентоспособности и создать условия для улучшения социально-экономического положения в стране.

Литература

1. Авдулов А.Н., Кулькин А.М. *Научные и технологические парки, технополисы и регионы науки*. — М.: Экономика, 2002.
2. Бородин В. А. *Стратегия управления инновационной фирмой*. — Новосибирск: Эко, 1996.
3. *Инновационные подходы в науке: теоретические и методологические проблемы* / под ред. Ю.Г. Волкова. — Ростов-на-Дону, 2001.
4. Коваленко Г.А., Пономаренко А.Н., Семенцева Г.И. // *Российский экономический журнал*. — 1999. — № 4. — С. 110–112.
5. Круглова Н. Ю. *Инновационный менеджмент*. — М.: Ступень, 2006.
6. Цапенко И.В., Юревич А.Б. // *Мировая экономика и мировые отношения*. — 2006. — № 9. — С. 34–44.

Поступила в редакцию 5.05.2008.

PARKS AND THEIR ROLE IN CREATION OF INNOVATIVE POTENTIAL OF A HIGH SCHOOL SCIENCE

V.M. Chertok¹, D.V. Chertok²

¹ Vladivostok state medical university, ² Far Eastern National University (Vladivostok)

Summary — In this work some questions of the organization of scientific and techno parks — the major elements of modern market system, the organizational form of co-work of higher educational institutions, consulting and innovative firms, and the industrial enterprises are considered. As in Vladivostok there are all conditions for creation of the parks, the leading high schools of city could become the initiators in the decision of this problem that would promote increase in innovative potential of a high school science.

Key words: scientific and techno parks, innovations, the organization of a high school science.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 95–98.

УДК 001:378.661(571.63)

В.Б. Шуматов, Е.В. Крукович, А.Я. Осин, Н.Г. Садова

Владивостокский государственный медицинский университет

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ В ПЕДАГОГИЧЕСКУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПРЕПОДАВАТЕЛЕЙ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА

Ключевые слова: научно-исследовательская работа, преподаватели медицинского вуза, педагогическая деятельность.

В соответствии с поставленной целью была разработана система внедрения результатов научно-исследовательской работы в педагогическую деятельность профессорско-преподавательского состава медицинского вуза. Структура данной системы состоит из мотивации, цели и задач, технологических документов, форм и содержания внедрения, критериев эффективности. Значительное место в системе занимает структурирование учебного материала и конструирование на этой основе соответствующих дидактических единиц усвоения. Усовершенствованная педагогическая деятельность способствует повышению уровня сформированности креативных качеств, умений, навыков и развитию творческой личности будущего специалиста.

До настоящего времени результаты научно-исследовательской работы (НИР) профессорско-преподавательского состава (ППС) медицинских вузов все еще не нашли должного внедрения в учебно-воспитательный процесс. В большей степени это связано с отсутствием общепринятых методологических при-

нципов внедрения НИР в систему профессиональных знаний, умений, навыков (ЗУН) будущих специалистов [1–4]. Однако активное использование результатов НИР в учебно-воспитательном процессе расширит сеть освоенных профессиональных ЗУН и увеличит их связь с изучаемой и базисными дисциплинами медико-биологического и общеклинического блоков. В то же время внедрение собственных результатов НИР вузов позволит приблизить систему вузовского обучения к научным проблемам кафедр и активизировать у студентов познавательную и научно-творческую (креативную) деятельность, создать предпосылки для расширения возможностей научно- и учебно-исследовательской работы, ознакомить их с особенностями региональной патологии и со службой здравоохранения в Приморском крае. Кроме того, изучение научных трудов профессорско-преподавательского состава предусматривает воспитание студентов примером личности препода-

давателя-исследователя. Следовательно, внедрение научных трудов ППС в учебно-воспитательный процесс на современных принципах педагогики обеспечит интеграцию профессиональных ЗУН по изучаемой проблеме и дисциплине, повысит уровень подготовки специалистов на основе развития их креативных качеств и мотивации учения [5–7].

Цель настоящей работы состояла в анализе условий и эффективности внедрения результатов НИР ППС, направленных на формирование профессиональных качеств, умений и навыков, развитие креативных способностей на основе педагогики творчества и подготовку творчески мыслящего и действующего специалиста в медицинском вузе.

Достижение поставленной цели возможно путем решения задач, включающих формирование у студентов профессиональных ЗУН по диагностике и дифференциальной диагностике, индивидуализации и коррекции лечения важнейших заболеваний и вариантов их течения на основе изучения результатов НИР профессорско-преподавательского состава и базисных интегрированных знаний и в процессе управляемой самостоятельной деятельности в учебное и внеучебное время. Наряду с профессиональными знаниями, умениями и навыками использование современных научных трудов в учебно-воспитательном процессе, формирование научно-творческой активности, профессионального мышления и поведения на принципах биомедицинской этики и деонтологии, развитие личностных и креативных качеств будущего врача в соответствии с государственными образовательным стандартом высшего медицинского образования [8–10].

На этой основе была разработана система внедрения результатов НИР ППС в педагогическую деятельность медицинского вуза. Основными формами внедрения научных трудов ППС в учебно-воспитательный процесс являются:

1. Широкое ознакомление студентов с основными направлениями научной деятельности, важнейшими достижениями в области науки и практики, основными научными трудами ППС (монографии, сборники научных трудов, изобретения, рацпредложения, научные статьи, методические рекомендации, информационные письма, учебные пособия для студентов и врачей);

2. Использование материалов НИР на лекциях, семинарах, практических занятиях, конференциях и др.;

3. Участие обучаемых в выполнении НИР совместно с ППС;

4. Проведение заседаний студенческих научных обществ с изучением материалов НИР ППС по актуальной тематике;

5. Организация выполнения индивидуальных и коллективных заданий по учебно- и научно-исследовательской работе с целью дальнейшего развития научных проблем;

6. Подготовка студенческих научных докладов для выступления на научных и научно-практических конференциях;

7. Инициирование самостоятельной деятельности студентов в учебное и во внеучебное время на основе результатов НИР;

8. Выполнение студентами специальных заданий по обзорам и реферированию научных трудов ППС, рекомендуемых для подготовки к практическим занятиям, семинарам, конференциям.

Использование научных материалов в обучении и воспитании сталкивается с определенными методическими сложностями. При этом возникает вопрос о педагогической целесообразности применения того или иного научного материала в учебно-воспитательном процессе. Качество и объем научных материалов не всегда соответствуют требованиям типовой образовательной программы, и в этой связи они должны быть отражены в рабочей программе по дисциплине или ее разделу. Именно в этом и состоит одно из различий между этими программами.

Содержание внедрений научно-исследовательской работы составляют изученные сотрудниками вуза показатели здоровья населения и организации лечебно-профилактической помощи, нормативные параметры, факторы риска, патогенетические механизмы патологий, инновационные технологии диагностики, уточненные и разработанные диагностические и дифференциально-диагностические критерии, варианты и особенности течения заболеваний (прежде всего в региональных условиях), оригинальные способы коррекции функций органов и систем организма, этиотропные и патогенетически обоснованное лечение важнейших нозологий и методы эффективной их профилактики. В зависимости от поставленной цели, методов и форм обучения объем материалов, используемых для внедрения, варьирует от 5–10 до 90–100% от бюджета учебного времени одной дидактической единицы усвоения. Логическая связь результатов НИР ППС вуза с основным содержанием обучения студентов существенно повышает эффективность подготовки будущих специалистов.

Технология превращения научных материалов в учебные возможна путем их структурирования или соответствующей дидактической «обработки». В результате структурирования вновь сформированный учебный материал может возрастать по уровню совершенствования от начального ознакомления (I уровня) до научно-творческого (IV уровня).

Структурирование учебного материала в организации познавательной деятельности является одним из важных условий. В связи с этим нами была поставлена цель — изучить методические принципы структурирования учебного материала и возможности их применения для активизации познавательной деятельности студентов в процессе обучения их в медицинском вузе.

Структурированием учебного материала является педагогическая технология, с помощью которой учебные элементы обучения (понятия, законы и закономерности, основные идеи и принципы, способы их передачи студентам и соответствующие действия студентов по их усвоению) выстраиваются в определенных связях и отношениях, включающих в себя логику процесса познания и его результаты, распознавание явлений, их упорядочивание и систематизацию, выявление и объяснение сущности явлений, преобразование явлений из одного в другое состояние.

Структурирование учебного материала имеет следующие цели:

- разработать наиболее рациональную и экономную структуру учебного материала для его усвоения в долговременной памяти;
- заложить в создаваемую структуру соответствующие способы уплотнения и развертывания материала и таким образом освободить студентов от необходимости держать в памяти большой объем учебных знаний в условиях беспрерывно увеличивающегося потока информации;
- сгруппировать и выстроить учебный материал таким образом, чтобы можно было внести в него аппарат учебно-познавательной деятельности, необходимый для успешного усвоения, развития познавательной и креативной деятельности.

При структурировании учебного материала следует руководствоваться важнейшими принципами ранжирования, ограничения, перерыва и непрерывности, свертываемости и развертываемости, выводимости. Согласно перечисленным принципам учебный материал дисциплины может быть представлен совокупностью систем знаний и теоретических положений в этих системах, этапами познания объекта и уровнем усвоения. На этой основе выделяются следующие ранги учебного материала:

- 1-й ранг — материал, не требующий доказательств;
- 2-й ранг — материал, требующий доказательств;
- 3-й ранг — материал с правилами и доказательствами о том, как преобразовать объект или явление;
- 4-й ранг — особый, сюда относят идеи и исходные теоретические положения, которые связывают описывающий, объясняющий и предписывающий материал в единое целое.

К структурному материалу относятся все понятия, содержание которых раскрывается без доказательств (свернутое описание) или с помощью объяснений (развернутое описание). Все понятия, поддающиеся определению, должны упорядочиваться в каждой теории и группироваться по соподчинению, смежности и сопряженности. Причем число этих понятий ограничивается критерием необходимости и достаточности.

Выделение дидактических единиц на основе ранжирования материала позволяет более успешно решать многие значимые задачи:

1. Формировать у студентов видение изучаемых явлений и объектов в глубоких и всесторонних связях и отношениях (функциональных, причинно-следственных, по смежности, сопряженности рода и вида);

2. Обеспечить постепенное движение студенческого видения изучаемых явлений от неглубокой сущности (сущности первого, свернутого описания) ко все более глубокой, от целого — к его составным частям, от абстрактного — к более конкретному;

3. В процессе изучения учебного материала каждого ранга в отдельности сформировать у студентов учебно-познавательный аппарат (аппарат описания, объяснения и преобразования) и на этой основе развить познавательную самостоятельность, творческие способности;

4. На основе познавательной самостоятельности формировать у студентов положительное отношение к учению и более прочные знания.

Следовательно, структурирование учебного материала и конструирование на этой основе соответствующих дидактических единиц усвоения с учетом принципов перерыва и непрерывности, целостности и системности, свертываемости и развертываемости, предопределяет методику эффективной организации познавательной деятельности студентов. В ходе этой деятельности студенты проявляют большую заинтересованность, более ответственное отношение к результатам учебной работы, к самому процессу учения, к характеру собственной деятельности.

Учебный материал, содержащий результаты НИР профессорско-преподавательского состава, должен быть доступен для изучения и отражаться в методических материалах. Незнание студентами достижений научно-исследовательской работы сотрудников вуза эквивалентно незнанию их личностей. К глобальным критериям эффективности внедрения результатов НИР следует отнести и реализацию принципа единства науки и практики, и обеспечение научной новизны учебного материала, и развитие творческой личности будущего специалиста. Итоги данной деятельности ППС документируются в специальных актах о внедрении результатов НИР в учебно-воспитательный процесс вуза и подтверждаются представителями комиссии из числа преподавателей-исследователей. Они отражают форму внедрения в учебно-воспитательный процесс по той или иной дисциплине, эффект от внедрения и дают заключение о возможности его использования в педагогической деятельности.

Следовательно, разработанная система внедрения результатов НИР в педагогическую деятельность по своей структуре содержит мотивацию, цель и задачи, элементы технологического процесса, различные формы внедрения и оценивается в конечном счете по уровню сформированности креативных качеств, умений и навыков и развитию творческой личности будущего специалиста.

Литература.

1. Белоус Е.И. // Педагогика, психология и философия проблем образования : материалы межвузовских научно-методических конференций. — Владивосток : Изд-во ДВГТУ, 2004. — С. 10–18.
2. Горовая Т.П. // Там же. — С. 5–8.
3. Калачева Т.Л. // Проблемы высшего образования : сборник научных трудов. — Хабаровск : Изд-во ХГТУ, 2004. — С. 130–132.
4. Колесникова Л.Н. // Педагогика, психология и философия проблем образования : материалы межвузовских научно-методических конференций. — Владивосток : Изд-во ДВГТУ, 2004. — С. 39–43.
5. Лончаков А.П. // Проблемы высшего образования : сборник научных трудов. — Хабаровск : Изд-во ХГТУ, 2004. — С. 53–55.
6. Макаренко М.А. // Там же. — С. 71–74.
7. Макаренко Т.А. // Педагогика, психология и философия проблем образования : материалы межвузовских научно-методических конференций. — Владивосток : Изд-во ДВГТУ, 2004. — С. 18–31.
8. Осин А.Я., Бениова С.Н., Садова Н.Г. // Тихоокеанский мед. журнал. — 2005. — № 2. — С. 86–90.
9. Осин А.Я., Ицкович А.И., Пономаренко Т.Н. и др. // Образование и медицинская наука 21 века. — Владивосток, 2000. — С. 45–53.
10. Осин А.Я., Окунь Б.В., Садова Н.Г. // Педагогика, психология и философия проблем образования : материалы межвузовских научно-метод. конференций. — Владивосток : Изд-во ДВГТУ, 2004. — С. 8–10.

Поступила в редакцию 07.05.2008.

INTRODUCTION OF RESULTS OF RESEARCH WORK IN PEDAGOGICAL ACTIVITY OF TEACHERS OF MEDICAL HIGH SCHOOL

V.B.Shumatov, E.V.Krukovich, A.Ya. Osin, N.G.Sadova
Vladivostok state medical university

Summary — According to the purpose the system of introduction of results of research work in pedagogical activity of the faculty of medical high school has been developed. The structure of the system will consist of motivation, the purpose and problems, technological documents, forms and the contents of introduction, criteria of efficiency. The significant place in system is occupied by the structurization of a teaching material and designing on this basis of corresponding didactic units of mastering. The advanced pedagogical activity promotes increase of level of creative qualities, skills, and to development of the creative person of the future expert.

Key words: research work, teachers of medical high school, pedagogical activity.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 98–101.

Вниманию авторов!

Редакционная коллегия Тихоокеанского медицинского журнала обращает внимание на необходимость соблюдения при подготовке статей изложенных ниже правил.

Статья должна иметь визу руководителя учреждения, в котором выполнена работа, и сопроводительное письмо на бланке организации с круглой печатью. Следует указать фамилию, имя, отчество и адрес (в т. ч. электронной почты) и телефон автора, с которым при необходимости редакция будет вести переписку. Статья должна быть подписана всеми авторами с указанием фамилий, имен, отчеств, ученых степеней и званий и мест работы каждого из них.

Статья должна быть напечатана на машинке или компьютере на одной стороне стандартного листа формата А4 с двойным интервалом между строками (56–60 знаков в строке, включая знаки препинания и пробелы, 29–30 строк на странице). Ширина полей: слева – 3 см, справа – 1 см. Принимаются первый и второй экземпляры. К статье прилагается 3,5-дюймовая дискета или компакт-диск с набором в формате Word'95/97 для Windows (с расширением *.doc и/или *.rtf).

Объем передовых и обзорных статей не должен превышать 12 страниц, оригинальных исследований – 8 страниц, сообщений методического и информационного характера – 4 страниц (за исключением иллюстраций, списка литературы и резюме). В начале первой страницы указываются: инициалы и фамилии авторов, название статьи, учреждение и город, где выполнена работа, а также ключевые слова (*не более четырех*).

Все цитаты, химические формулы, таблицы и дозировки препаратов, приводимые в статьях, должны быть тщательно выверены и подписаны на полях автором.

Сокращение слов, имен и названий (кроме общепринятых) без расшифровки не допускается, количество аббревиатур, словосочетаний, наиболее часто встречающихся в тексте, с расшифровкой – *не более четырех*. Единицы измерения даются по системе СИ.

Оригинальная статья должна иметь следующие рубрики:

«**Введение**», в котором кратко излагается современное состояние вопроса и обосновывается актуальность исследования;

«**Материал и методы**» с кратким описанием процедур получения результатов (в экспериментальных работах необходимо ссылаться на «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», указывать способы обезболивания и выведения животных из опыта). При статистической обработке данных необходимо указывать использованные методы и приводить наименования показателей;

«**Результаты исследования**», где приводится сжатое и обобщенное изложение конкретных результатов работы *без их обсуждения*;

«**Обсуждение полученных данных**» не должно повторять «результаты исследования», но представлять итоги их анализа с привлечением данных литературы. В конце «обсуждения» целесообразно суммировать основные положения или сформулировать выводы.

Количество иллюстраций (фотографий, рисунков, диаграмм, графиков) не должно превышать 3. Фотографии должны быть черно-белыми, прямоугольными и контрастными, рисунки – четкими, диаграммы и графики выполнены тушью или на компьютере. На обороте второго экземпляра

иллюстрации мягким карандашом указываются ее номер, фамилия первого автора, название статьи, обозначаются верх и низ. Рисунки и фотографии следует вкладывать в отдельный конверт, на котором указываются фамилия первого автора и название статьи. Подписи к иллюстрациям даются на отдельном листе в 2 экземплярах в порядке нумерации рисунков. В подписях к микрофотографиям указывают метод окраски и увеличение. Место в тексте, где должна быть иллюстрация, следует пометить квадратом на левом поле. В квадрате указывается номер иллюстрации.

Если иллюстрации (черно-белые) представляются в электронном виде, они должны быть приложены в виде отдельных файлов в формате TIFF (расширение для PC – *.tif) или JPEG с минимальной компрессией (расширение *.jpg) в натуральную величину с разрешением 300 ppi (точек на дюйм). **Рисунки в виде внедренных в Word файлов не принимаются!**

Таблицы должны быть наглядными, озаглавленными и пронумерованными, заголовки граф – соответствовать их содержанию, цифры, приведенные в таблицах, не должны повторяться в тексте.

Библиографические ссылки в тексте приводятся в квадратных скобках, по номерам – в соответствии с приставным списком литературы. Библиография должна содержать как отечественные, так и иностранные работы за последние 10–15 лет. Лишь в случае необходимости допускаются ссылки на более ранние труды. В оригинальных статьях цитируются не более 15 источников, в передовых статьях и обзорах – не более 30. Авторы несут ответственность за правильность библиографических данных.

Приставная литература оформляется в соответствии с ГОСТом 7.1–84. Источники нумеруются и указываются строго в алфавитном порядке (сначала работы отечественных авторов, затем – иностранных) в оригинальной транскрипции. Работы отечественных авторов, опубликованные на иностранных языках, помещаются среди работ иностранных авторов в общем алфавитном порядке, а работы иностранных авторов, опубликованные на русском языке, – среди работ отечественных авторов в общем алфавитном порядке.

Если статья написана коллективом авторов, то указываются первые три фамилии, а далее ставится «и др.». Если авторов всего 4, то указываются все авторы. Ссылки на статьи из журналов и сборников оформляются так: Автор (Фамилия И.О.) Название // (две косые линии) Название журнала или сборника. – Место издания, год. – С. (страницы) от–до. Ссылки на монографии оформляются следующим образом: Автор. Полное название книги. – Место издания: название издательства, год. – (количество страниц) с. Монография, написанная коллективом авторов (более 4 человек), помещается в списке по заглавию книги. Через косую черту после заглавия указываются фамилии трех авторов, а далее ставится «и др.».

К статье прилагается резюме на русском языке объемом до 0,5 страницы в 2 экземплярах.

Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять рукописи.

Работы направлять по адресу:

690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2.

Владивостокский государственный медицинский университет,

редакция Тихоокеанского медицинского журнала.

Не принятые к опубликованию работы авторам не возвращаются.