

УДК 578.74:57.083.222/.083.224

АНТИГЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ ОРТОХАНТАВИРУСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ МЫШЕЙ СЕМЕЙСТВА APODEMUS**Компанец Г.Г., Иунихина О.В., Потт А.Б.***ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», Владивосток, e-mail: galkom@inbox.ru*

Цель данного исследования состояла в изучении антигенных характеристик штаммов ортохантавирусов, выделенных в Приморском крае от природных носителей – полевой и восточноазиатской мышей в реакции нейтрализации (РН). Проанализированы антигенные характеристики 10 штаммов, включая 2 выделенных от *Apodemus agrairus*, 5 штаммов от *A. peninsulae* и 3 прототипных штамма вирусов Hantaan, Seoul и Puumala. Показаны четкие антигенные различия между штаммами всех исследованных серотипов и возможность их дифференциации с помощью иммунных сывороток к гомологичным и гетерологичным антигенам в указанной серологической реакции. В то же время по антигенным свойствам штаммы, выделенные от восточноазиатской мыши, разделены на три группы: Amur, Hantaan-подобные и штаммы без четкой дифференциации серотипа. Все исследованные штаммы, выделенные от полевой мыши, однозначно отнесены к серотипу Hantaan.

Ключевые слова: штаммы ортохантавирусов, антигенные свойства, Hantaan, Amur**ANTIGENIC CHARACTERISTICS OF ORTHOHANTAVIRUS STRAINS, ISOLATED FROM APODEMUS MICE****Kompanets G.G., Iunikhina O.V., Pott A.B.***Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, e-mail: galkom@inbox.ru*

The aim of our study was to evaluate the antigenic characteristics of orthohantavirus strains, isolated from field striped mice and forest mice, the natural reservoirs of orthohantaviruses in Primorski Krai by means of neutralization test. The antigenic analyses included 10 strains, a propos, 2 strains isolated from *Apodemus agrairus*, 5 strains from *A. peninsulae* and 3 prototype strains of Hantaan, Seoul and Puumala viruses. Clear antigenic differences between all evaluated serotypes were revealed and the possibility of their differentiation using immune sera to homological and heterological antigens in abovementioned test was established. However, all strains, originated from *A. peninsulae* formed three antigenically different groups: Amur-like, Hantaan-like and not differentiated strains. Contrarily, all strains isolated from *A. agrairus* belonged to Hantaan serotype.

Keywords: orthohantavirus strains, antigenic characteristics, Hantaan, Amur

Серологическая классификация вирусов традиционно основывается на классических подходах к выявлению антигенных различий. В частности, перекрестное взаимодействие штаммов в разных серологических тестах, наряду с результатами генетического анализа, стало основой выделения вирусов в отдельный род *Hantavirus* семейства *Bunyaviridae* [1]. В 2016 г. решением рабочей группы по *Bunyaviridae* Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) создан новый порядок *Bunyavirales*, включающий 8 семейств, в том числе *Hantaviridae*, и предложено новое название рода *Orthohantavirus* [2]. Согласно новой классификации на территории Приморского края установлена циркуляция по меньшей мере 4 видов ортохантавирусов: *Hantaan* (включая *Amur*), *Seoul*, *Puumala* (ранее *Hokkaido*) и *Fusong* (ранее *Vladivostok*). До настоящего времени подтверждена роль только первых двух вирусов в этиологии геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) [3]. Генетические особенности ортохантавирусов, циркулирующих в нашем регионе, хорошо представлены

Л.Н. Яшиной [4], тогда как антигенные характеристики штаммов этих вирусов, выделенных из разных источников – от диких/ синантропных грызунов и больных ГЛПС, изучены недостаточно.

Цель данного исследования: изучить антигенные характеристики штаммов ортохантавируса *Hantaan*, выделенных от мышей *Apodemus agrairus* и *A. peninsulae*.

Материалы и методы исследования

В работе использованы штаммы рабочей коллекции лаборатории хантавирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова (табл. 1).

Выделение штаммов ортохантавирусов, накопление антигенов для проведения серологических реакций проводили на клеточной культуре Vero E-6, используя стандартные методики, коммерческие реактивы и питательные среды для культивирования клеток.

Для идентификации выделенных изолятов использовали реакцию нейтрализации, основанную на подавлении образования фокусов, которую проводили по методике Lee P.W. и соавт. [5]. Кратко, в равных объемах смешивали двукратные разведения сывороток крови иммунизированных животных (от 1:32 до

1:1024), 50-100 фокусобразующих единиц (ФОЕ) вируса и комплемент (1:100) и инкубировали 1 час при 37°C, после чего вышеуказанную смесь вносили в дозу 0,2 мл в лунки 24-луночных планшетов с моно-слоем клеток Vero E6. После контакта в течение часа при 37°C инокулят сливали, монослой однократно отмывали средой MEM и вносили 0,8 мл полужидкого покрытия, состоящего из среды Игла МЭМ, содержащей 0,6% карбоксиметилцеллюлозы, 2,0% СЭК, антибиотики. Планшет с инфицированными клетками инкубировали в течение 10–11 дней при 37°C в термостате с 5% содержанием CO₂. Учет реакции проводили через 8–10 дней. Полужидкое покрытие сливали, клетки промывали один раз (для отмывки использовали 0,85% раствор NaCl). После чего клетки фиксировали абсолютным спиртом при комнатной температуре по 400 мкл/лунку (15, 20 минут), после удаления фиксатива клетки отмывали 0,85% раствором NaCl (3x10 минут). Затем вносили специфическую антихантавирусную сыворотку (сыворотка реконвалесцента ГЛПС, исходный титр 1:2048) в разведении 16–32 ед. по 200 мкл/лунку. После инкубации монослой отмывали (3x5 минут) раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащим 1% Твин-20, и вносили меченный пероксидазой белок «А» 200 мкл/лунку (исходный титр 1:20000, 8–16 ед., разведение на трис-буфере с 0,05% раствором Твин-20 и 0,1% бычьего сывороточного альбумина) на 60 мин. при 37°C. Затем монослой отмывали 0,85% раствором NaCl (3x5 минут). Для выявления фокусов в лунки вносили субстрат по 400 мкл (рабочий раствор субстрата: к 8 мл ФСБ добавлены 1 мл раствора 3,3'-диаминобензидина, 1 мл 0,6% раствора NiCl₂ и 4 мкл 30% H₂O₂). Фокусы проявлялись в течение 5–15 минут, после чего панель промывали проточной водой, подсушивали и подсчитывали их количество. Титр вируса выражали в десятичных логарифмах, по количеству фокусов, образованных при внесении 0,2 мл вирусосодержащей жидкости в лунку, и выражали в Ig/1,0 мл. Титр нейтрализующих антител определяли по разведению сыворотки крови, приведенному к уменьшению количества фокусов на 80%.

В качестве прототипных использовали штаммы 76–118 вируса *Hantaan*, Seo 80–39 вируса *Seoul* и CG 18–20 вируса *Puumala*. Гипериммунные сыворотки к выделенным и прототипным штаммам ортохантавирусов получали при иммунизации беспородных

самцов белых крыс 4-недельного возраста при подкожном введении вирусосодержащей жидкости с титром не менее 4,5 Ig ФОЕ/1,0 мл, объем введения составлял 0,5 мл. Перед использованием в реакции нейтрализации иммунные сыворотки инактивировали нагреванием на водяной бане при температуре 56°C в течение 40 мин.

Результаты исследования и их обсуждение

При проведении перекрестной реакции нейтрализации с иммунными сыворотками получены следующие результаты (табл. 2).

Между штаммами, выделенными от полевых мышей из Приморского края (ПМ-10508-89 и ПМ-95) и Южной Кореи (прототипный штамм 76–118 вируса *Hantaan*), выявлено близкое антигенное родство, разность титров нейтрализующих антител (нАТ) в перекрестных реакциях составляла 0–4.

Штаммы, выделенные от восточноазиатской мыши, характеризовались неоднородной картиной антигенных взаимоотношений. Штамм ВАМ 15-99, первый штамм, выделенный на культуре клеток в Приморском крае, может считаться прототипным штаммом серотипа Amur. Его антигенное отличие от штаммов, выделенных от полевой мыши, подтверждается результатами реакции нейтрализации: разность титров нАТ в иммунной сыворотке, полученной к этому штамму, к гетерологичным антигенам составляет более 4, что соответствует серологическому критерию серотипа хантавируса [1, 6]. Тогда как по разнице титров нАТ к гомологичным и гетерологичным антигенам (≤ 4) штаммы, ВАМ 25-04, ВАМ 26-04 и штамм ВАМ 16-04 имеют родство как к серотипу *Hantaan*, так и к серотипам Amur и Seoul. Штамм ВАМ 6-04 имеет близкое антигенное родство только с штаммами, выделенными от полевой мыши.

Таблица 1

Сведения о штаммах ортохантавирусов, использованных в исследовании

№ п/п	Источник выделения штамма	Название штамма в рабочей коллекции	Географическое происхождение	Год выделения
1	<i>Apodemus agrairus</i>	ПМ-79-95	Приморский край, Спасский р-он	1996
2	<i>Apodemus agrairus</i>	ПМ-10508-89	Приморский край, Спасский р-он	1989
3	<i>Apodemus peninsulae</i>	ВАМ 6-04	Приморский край, Надеждинский р-н	2004
4	<i>Apodemus peninsulae</i>	ВАМ-15-99	Приморский край, Надеждинский р-н	2000
5	<i>Apodemus peninsulae</i>	ВАМ-25-04	Приморский край, Надеждинский р-н	2004
6	<i>Apodemus peninsulae</i>	ВАМ-26-04	Приморский край, Надеждинский р-н	2004
7	<i>Apodemus peninsulae</i>	ВАМ-16-04	Приморский край, Надеждинский р-н	2004
8	<i>Apodemus agrairus</i>	76-118	Korea	1976
9	<i>Rattus norvegicus</i>	Seo 80-39	Korea	1980
10	<i>Myodes glareolus</i>	CG 18-20	Россия	1984

Таблица 2

Результаты идентификации штаммов ортохантавирусов иммунными сыворотками в реакции нейтрализации

Иммунные сыворотки	Штаммы, выделенные от <i>A. agrairus</i> и <i>A. peninsulae</i>							Прототипные штаммы		
	ПМ-79-95	ПМ-10508-89	ВАМ-6-04	ВАМ-15-99	ВАМ-25-04	ВАМ-26-04	ВАМ-16-04	76-118	Seo 80-39	CG 18-20
ПМ-79-95	512	512	128	< 32	< 32	< 32	< 32	256	< 32	< 32
ПМ-10508-89	256	512	128	< 32	< 32	64	< 32	64	< 32	32
ВАМ-6-04	128	256	256	< 32	< 32	32	32	128	< 32	< 32
ВАМ-15-99	< 32	< 32	< 32	256	64	64	32	< 32	< 32	< 32
ВАМ-25-04	32	32	< 32	64	128	64	64	32	32	< 32
ВАМ-26-04	32	32	< 32	128	64	128	32	< 32	32	< 32
ВАМ-16-04	32	32	< 32	64	32	32	128	32	32	< 32
76-118	256	256	128	< 32	32	32	64	512	< 32	< 32
Seo 80-39	64	64	< 32	64	< 32	32	< 32	< 32	1024	< 32
CG 18-20	< 32	< 32	< 32	< 32	< 32	< 32	< 32	< 32	< 32	128

Примечание. В таблице представлены обратные значения титров антител.

Результаты перекрестных реакций иммунных сывороток, приготовленных к исследованным штаммам и прототипному штамму CG 1820, со всей очевидностью свидетельствуют о том, что все исследованные штаммы ортохантавирусов, выделенные от диких грызунов в Приморском крае, не имели антигенного родства с вирусом *Puumala*.

Несмотря на длительную историю изучения вирусов, концепция определения вида в вирусологии до конца не разработана. Один из способов видовой дифференциации основан на изучении антигенных характеристик, однако существование постоянного антигенного дрейфа, дающего множество серологических типов одного вируса, уменьшает ценность серологического критерия в определении вида. В каждом случае вопрос об определении видовых границ решается индивидуально, так для хантавирусов был принят следующий критерий: разница титров нейтрализующих антител к гомологичному и гетерологичному антигенам должна превышать 4 [1, 5, 6].

Приморский край является уникальным очагом ортохантавирусной инфекции, в котором циркулирует несколько гено/серотипов ортохантавирусов в популяциях разных резервуарных хозяев, включая три патогенных для человека. Еще в конце прошлого века в работе Р.А. Слоновой и соавт. (1990 г.) на основании результатов исследования 15 штаммов ортохантавирусов, выделенных от больных ГЛПС и разных видов грызунов, в реакции нейтрализации и в непрямом методе флюоресцирующих антител с использованием моноклональных антител (МКА) сделано предположение об антигенном различии ортохантавирусов, вы-

деленных от полевой и восточноазиатской мышей.

Как известно, антигенные и генетические варианты вируса в ряде случаев могут коррелировать, в других случаях – используются как разные подходы к характеристике одного вируса, то есть могут заменять, дополнять друг друга или быть единственной характеристикой вида. Выделение большего количества штаммов от мышей рода *Apodemus* позволило выявить четкие серологические и генетические различия, соответствующие критерию уникальности, и доказать самостоятельность серо/генотипа Amur [7–10]. Следует отметить, что несмотря на широкий ареал этого вируса, охватывающий Дальний Восток России, Китай и Корею, случаи ГЛПС, связанные с вирусом *Amur*, до настоящего времени зарегистрированы только на территории Российской Федерации [11].

Более четкие результаты при определении вида вируса дает использование в серологических реакциях МКА и изучение генов и их продуктов путем определения первичной структуры. Это привело к пересмотру классификации хантавирусов в 2016 г. [2], и в настоящее время вид ортохантавирусов *Hantaan* включает геноварианты *Hantaan*, *Amur* и *Soochong*.

Результаты наших исследований свидетельствуют о высоком родстве штаммов, выделенных от полевой мыши, что детерминировано высокой гомологией нуклеотидных и аминокислотных последовательностей РНК ортохантавирусов, принадлежащих к географическому геноварианту *Far East* вируса *Hantaan* [4]. Неоднородность антигенных характеристик штаммов, выделен-

ных от восточноазиатской мыши, в частности выделение отдельного серотипа *Amur* в рамках существующего вида, также может быть обусловлено наличием маркерных аминокислотных замен, характерных только для данного геноварианта [4].

Таким образом, несмотря на высокое генетическое родство ортохантавирусов вида *Hantaan*, циркулирующих у мышей рода *Apodemus*, антигенные характеристики штаммов позволяют выделить по меньшей мере два серотипа, связанные с грызунами разных видов.

Список литературы

1. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome / Schmaljohn C.S. et al. // *Science*. – 1985. – Vol. 227. – P. 1041–1044.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2016 Release, EC 48, Budapest, Hungary, August 2016: [Электронный ресурс]. – URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (дата обращения: 01.08.2017).
3. Слонова Р.А. Современные аспекты природной очаговости хантавирусной инфекции в Приморском крае / Р.А. Слонова, Т.В. Кушнарера, Г.Г. Компанец // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2008. – № 2. – С. 5–9.
4. Яшина Л.Н. Генетическое разнообразие хантавирусов в популяции грызунов и насекомых азиатской части России: дис. ... д-ра биол. наук. – Кольцово, 2012. – 264 с.
5. Serotypic classification of hantaviruses by indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests / Lee P.W. et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1985. – Vol. 22, № 6. – P. 940–944.
6. Serological relationships among viruses in the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. / Chu Y.K. et al. // *Virology*. – 1994. – Vol. 198, № 1. – P. 196–204.
7. The first complete genomic characterization of an Amur virus isolate from China / Zhang Y. et al. // *Archives of Virology*. – 2013. – Vol. 158, № 10. – P. 2185–2188.
8. Bi Z. Hantavirus infection: a review and global update / Bi Z., Formenty P.B.H., Roth C.E. // *Journal of Infections in Developing Countries*. – 2008. – Vol. 2, № 1. – P. 3–23.
9. Кушнарера Т.В. Идентификация вирусов Hantaan и Amur и вызываемых ими инфекций в модифицированных тестах торможения гемагглютинации / Т.В. Кушнарера, Г.Г. Компанец // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 11–2. – С. 329–334.
10. Tischler N.D. Characterization of cross-reactive and serotypespecific epitopes on the nucleocapsid proteins of hantaviruses // Tischler N.D., Roseblatt M., Valenzuela P.D. // *Virus Researches*. – 2008. – Vol. 135. – P. 1–9.
11. A comparative study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia / Kariwa H. et al. // *Japanese Journal of Veterinary Research*. – 2007. – Vol. 54, № 4. – P. 145–161.