

**Иунихина Ольга Викторовна,**

*канд. мед. наук, науч. сотр.;*

**Компанец Галина Геннадиевна,**

*канд. мед. наук, вед. науч. сотр.,*

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение*

*«Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»,*

*г. Владивосток, Приморский край, Россия*

## **ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ ОРТОХАНТАВИРУСОВ IN VIVO, КАК РЕЗУЛЬТАТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**

На вирусы, в том числе ортохантавирусы, находящиеся во внешней среде, действует комплекс разнообразных биотических и абиотических факторов, влияющих, в том, числе, на биологические свойства патогена. Цель работы – показать изменение биологических свойств ортохантавируса после взаимодействия с субстратами внешней среды при экспериментальной инфекции *in vivo*. В работе использованы два штамма ортохантавируса: в качестве контроля – штамм Аа 60343 79-95 (ПМ-95), геновариант *Far East*, ортохантавируса *Hantaan*, выделенный от полевой мыши, отловленной в Спасском районе Приморского края; экспериментальный вирус ПМ-95<sub>луг</sub> получен после адсорбции исходного на луговой почве и инкубации при 4°C в течение 7 дней с последующей десорбцией белоксодержащим раствором. Изучение вирулентности и иммуногенности экспериментального вируса проводили на модели заражения белых лабораторных мышей-сосунков и белых лабораторных крыс, соответственно. В результате показано снижение вирулентных свойств ортохантавируса к третьему пассажу с уменьшением количества вируса в органах-мишенях вплоть до полного отсутствия, при сохранении способности вызывать образование специфических антител, но в более низком титре, по сравнению с оригинальным штаммом. Эти данные свидетельствуют о том, что селекция высоко- и низковирулентных клонов вирусной популяции может происходить под воздействием некоторых абиотических факторов окружающей среды.

**Ключевые слова:** ортохантавирус, фенотип, биологические свойства, вирулентность, лабораторные животные.

***Olga V. Iunikhina ,***

*PhD, scientific researcher;*

***Galina G. Kompanets,***

*PhD, leading researcher,*

## PHENOTYPIC PLASTICITY OF ORTHOHANTAVIRUS IN VIVO AS RESULT OF ENVIRONMENTAL EFFECTS

Wide range of various biotic and abiotic factors affects different viruses such as hantaviruses, excreted by their host to the environment, including a change of their biological properties. The aim of the work is to show the change in the biological properties of orthohantavirus after interaction with the substrates of the environment during experimental orthohantavirus infection in vivo. Two strains of orthohantavirus were used: parental strain, Far East Aa 60343 79-95 Hantaan virus (PM-95), isolated from the field mouse caught in the Spassky region of Primorsky Krai was used as a control; the experimental strain PM-95 meadow was eluted after adsorption of the parent virus on meadow soil and incubation at 4°C for 7 days followed by desorption with a protein-containing solution. The virulence and immunogenicity of the experimental virus were studied in a model of white laboratory suckling mice and adult white laboratory rats, respectively. As a result, the virulence of orthohantavirus to mice was reduced and the content of viral antigen decreased to the point of disappearance in the all examined organs to the third passage, while immunogenicity retained however with lower titers of antibodies. These data indicate that the selection of high- and low-virulence clones of the viral population can occur under the influence of certain abiotic environmental factors.

**Keywords:** orthohantavirus, phenotype, biological properties, virulence, laboratory animals.

Ортохантавирусы (отряд *Bunyavirales*, семейство *Hantaviridae*, род *Orthohantavirus*) являются возбудителями зоонозных, природно-очаговых инфекций, таких как хантавирусный легочный синдром (ХЛС) в Новом Свете и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) на Евразийском континенте [5; 10]. Самой многочисленной группой среди инфицированных вирусом мелких животных являются мышевидные грызуны [5]. Попадая в окружающую среду с экскретами природных хозяев, ортохантавирус способен сохраняться в течение определённого времени, не теряя инфекционности, что определяет воздушно-пылевой путь заражения людей [7; 9].

Вирусы, в том числе ортохантавирусы, находящиеся во внешней среде, вне чувствительного организма подвергаются воздействию комплекса

абиотических и биотических факторов, которые могут повлиять на их биологические свойства [4].

**Цель работы:** показать изменение биологических свойств ортохантавируса после взаимодействия с субстратами внешней среды при экспериментальной ортохантавирусной инфекции *in vivo*.

**Материалы и методы.**

В работе использованы штаммы ортохантавируса, полученные из коллекции микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова.

В качестве контроля был использован штамм *Aa 60343 79-95* (ПМ-95) геновариант *Far East* ортохантавируса *Hantaan*, выделенный от полевой мыши, отловленной в Спасском районе Приморского края. Экспериментальный вирус ПМ-95<sub>луг</sub> получен после адсорбции исходного на луговой почве и инкубации при 4°C в течение 7 дней с последующей десорбцией белоксодержащим раствором (5% белковый сывороточный альбумин на фосфатно-солевом буфере pH 7,2) [2]. Полученный элюат до заражения животных пассировали в течение 2 пассажей на культуре клеток Vero E6 с добавлением 5% фетальной сыворотки коров для накопления инфекционного вируса. Титры обоих штаммов ортохантавируса, используемых в работе составили 4,4 lg ФОЕ/мл.

Вирусосодержащие жидкости разливали по аликвотам и хранили при -80°C для последующих экспериментов.

Для изучения вирулентности вируса ПМ-95<sub>луг</sub> в качестве лабораторной модели были взяты беспородные белые мыши в возрасте 24-48 часов. Первоначально животных заражали путем введения вирусосодержащей жидкости экспериментально полученного штамма ПМ-95<sub>луг</sub> в мозг в дозе 0,01 мл (1 пассаж). Через определённые периоды времени животных вскрывали под общим наркозом, определяли наличие антигена ортохантавируса в образцах мозга/специфических антител и готовили 10% суспензии мозга. Последовательно профильтрованным пулом 10% мозговых суспензий заражали следующую группу животных тем же методом, проводя 2 и 3 пассажи. После

заражения лабораторных животных их клиническое состояние оценивали ежедневно до 40 дня. Выведение животных из опыта производили с помощью диэтилового эфира на 17-20, 30 и 40 день после инфицирования.

Для изучения иммуногенных свойств вируса ПМ-95<sub>луг</sub> использовали белых крыс в возрасте 3-х недель, заражение проводили внутримышечно по 0,5 мл вирусосодержащей жидкости.

В качестве контроля использовали те же модели лабораторных животных, зараженных исходным штаммом (ПМ-95).

Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях». Уход за инфицированными животными и работу с ними осуществляли в условиях вивария с уровнем безопасности Р-3 (BSL-3).

Титр специфических антител к ортохантавирусу определяли в сыворотке крови животных непрямым методом флюоресцирующих антител (НМФА), используя заранее приготовленные слайды с клетками Vero E6, содержащими антиген гомологичного штамма хантавируса *Hantaan*, геновариант *Far East*, и антивидовые иммуноглобулины против иммуноглобулинов мыши, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (производство Института им. Н.Ф. Гамалеи, Москва).

Титр инфекционного вируса в вирусосодержащих жидкостях и в 10% суспензиях органов (мозг, легкие) инфицированных животных определяли с помощью метода выявления инфекционных фокусов под полужидким покрытием 0,6% карбоксиметилцеллюлозы, и выражали в фокусобразующих единицах в 1 мл (ФОЕ/мл).

### **Результаты**

В результате исследований было показано, что в контрольной группе животных с 17 дня наблюдались первые признаки типичной хантавирусной инфекции, характерные для данной модели: вялость, взъерошенность шерсти,

потеря в массе, атаксия. Затем присоединялись парезы задних лап, переходящие в параличи. Состояние животных резко ухудшалось вплоть до агонального. Летальность среди животных данной группы составила 100% на 20 сутки после инфицирования. Ортохантавирус обнаруживался только в суспензии мозга погибших животных в титре 1,0-2,0 Ig ФОЕ/мл.

Заражение экспериментальным вирусом ПМ-95 луг другой группы новорожденных мышей показало, что животные на протяжении 3 пассажей оставались клинически здоровы весь срок наблюдения. Изучение распределения вируса ПМ-95 луг в органах показало, что на первом пассаже персистенция вируса наблюдалась только в мозге на 20 день после инфицирования, но у 100% животных, во втором – на 20 день у 43% (в мозге и легких) животных, на 30 и 40 дни по 25% только в суспензии мозга. На третьем пассаже вирус в мозге и легких не обнаруживался.

Также установлено, что, несмотря на снижение вирулентности до полного её отсутствия, ортохантавирус сохранял свою иммуногенность после взаимодействия с субстратом внешней среды. При проведении первого пассажа на новорожденных белых мышах на 20 день наблюдения у животных специфические антитела в крови не определялись, в дальнейшем, несмотря на отсутствие клинических проявлений инфекции и обнаружения вируса в органах-мишенях, антитела присутствовали в крови всех животных, а средние значения увеличивались (на 30 день наблюдения 1:56, на 40- 1:60). На втором пассаже анти-хантавирусные антитела обнаруживались на 20 день после инфицирования только у 71,4% животных, среднее значение титра составило 1:11,4, а на третьем пассаже специфические антитела на всем протяжении наблюдения не определялись. В контрольной группе мышей, погибших от экспериментальной хантавирусной инфекции на 20 день, среднее значение титра анти-хантавирусных антител в крови составило 1:22,8, при этом антитела присутствовали у 50% животных.

В результате исследования возможности использования ортохантавируса, полученного после взаимодействия с субстратом внешней среды, для

получения иммунных сывороток на модели 3 недельных белых крыс установлено статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение средних значений титра специфических антител в ответ на введение ПМ<sub>95-луг</sub> (1:101,3), по сравнению со средним значением титра специфических антител в ответ на введение ПМ-95 (1:682,6). Животные оставались клинически здоровы до 40 дня наблюдения, как в контрольной, так и опытной группе.

Несмотря на изменение свойств вируса ПМ-95<sub>луг</sub>, связанных с воспроизведением экспериментальной инфекции на не самой оптимальной лабораторной модели животных, такие биологические свойства, как чувствительность к культуре клеток Vero E6 и способность формировать идентичные по размеру и форме фокусы под полужидким покрытием, с первого пассажа не отличались от исходного штамма.

### ***Обсуждение***

Известно, что вирусы, как абсолютные внутриклеточные паразиты, попав в окружающую среду, способны выживать определённое время. При этом абиотические факторы способны не только влиять на сроки сохранения вирусов вне организма чувствительного хозяина, но и изменять их свойства, в том числе биологические [4]. Неблагоприятные условия окружающей среды приводят не только к аттенуации микроорганизмов, но и селекции низко- и авирулентных форм.

В серии экспериментов установлено, что хантавирус после адсорбции на луговой почве и сохранении в этом комплексе при температуре +4°C в течение 7 дней при внутримозговом пассировании на белых лабораторных мышках сосунках утратил способность вызывать характерную для данной модели заражения хантавирусную инфекцию [3]. Хотя для штаммов геноварианта *Far East* установлено не только нарастание титра ортохантавируса при внутримозговом пассировании, но и сокращение инкубационного периода с сохранением всех клинических симптомов [1]. При изучении иммуногенных свойств вируса ПМ-95<sub>луг</sub> установлено более позднее начало антителообразования у экспериментальных животных при внутримозговом

заражении и образование специфических антител в более низких титрах при иммунизации белых крыс по сравнению с исходным штаммом. Культивирование с целью увеличения титра инфекционного экспериментального вируса ПМ-95<sub>луг</sub> на культуре клеток Vero E6 в течение двух пассажей перед заражением животных не способствовало восстановлению исходной вирулентности.

Известно, что популяция вирусов представляет собой гетерогенную совокупность вирионов, с непрерывно меняющимся соотношением клонов, обладающих разной вирулентностью. Таким образом, в составе популяции высоковирулентного вируса могут в небольшом количестве содержаться клоны со сниженной вирулентностью. Ранее в работе Tamura M. et al [11] показаны различия в вирулентности для лабораторных мышей двух клонов штамм 76-118 ортохантавируса *Hantaan* при сохранении других культуральных свойств (чувствительность к культуре клеток, размер и форма фокусов, скорость роста), что позднее было объяснено единичными заменами аминокислот в поверхностных гликопротеинах, отвечающих за прикрепление к чувствительным клеткам и вирулентность для животных в эксперименте [6; 8].

### ***Вывод.***

Таким образом, возможно под действием таких абиотических факторов внешней среды, как адсорбция на частицах луговой почвы и хранение образовавшегося комплекса при 4°C в течение 7 дней, произошло частичное изменение фенотипа исходного штамма ортохантавируса, приведшее к изменению ряда его биологических свойств. Такое воздействие некоторых факторов окружающей среды, возможно, способствует селекции низко- и авирулентных клонов вирусной популяции. Для выяснения материальной основы различий в вирулентности двух исследуемых в работе штаммов ортохантавируса в дальнейшем необходимо провести молекулярно-генетические исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астахова Т.И., Слонова Р.А., Компанец Г.Г. Подходы к выбору штамма вируса Хантаан для разработки инактивированной мозговой вакцины // *Вопросы вирусологии*. – 1997. – №3: – С. 105-108.
2. Иунихина О.В., Компанец Г.Г. Экспериментальное изучение сохранения хантавируса в комплексах с субстратами внешней среды // *Вопросы вирусологии*. – 2016. – №1. С.31-33, doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-1-31-33.
3. Компанец Г.Г Биологические свойства хантавирусов, циркулирующих в Приморском крае // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2008. – №2(32). – С. 61-64.
4. Мусиев Д.Г., Вышемирский И.П. Биологические свойства штаммов вируса ящура, выделенных из объектов внешней среды // *Известия ОГАУ*. – 2005. – №6(1). – URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/biologicheskie-svoystva-shtamov-virusa-yaschura-vydelennyh-iz-obektov-vneshney-sredy> (дата обращения: 05.05.2017).
5. Dearing M.D., Dizney L. Ecology of hantavirus in a changing world. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1195: 99-112, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05452.x.
6. Ebihara H, Yoshimatsu K, Ogino M, Araki K, Ami Y, Kariwa H, Takashima I, Li D, Arikawa J. Pathogenicity of Hantaan virus in newborn mice: genetic reassortant study demonstrating that a single amino acid change in glycoprotein G1 is related to virulence. *J Virol*. 2000; 74(19): 9245-9255.
7. Hardestam J., Simon M., Hedlund K.O., Vaheri A., Klingstrom J., Lundkvist A. Ex vivo stability of the rodent-borne Hantaan virus in comparison to that of arthropod-borne members of the Bunyaviridae family. *App. end environmental microbial*. 2007; 73(8): 2547-2551, doi: 10.1128/AEM.02869-06.
8. Isegawa Y., Tanishita O., Ueda S., Yamanishi K. Association of serine in position 1124 of Hantaan virus glycoprotein with virulence in mice. *J Gen Virol*. 1994;75 (11): 3273-3278, doi: 10.1099/0022-1317-75-11-3273.
9. Kallio E.R., Klingstrom J., Gustafsson E., Manni T., Vaheri A., Henttonen H., Vapalahti O., Lundkvist E. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J. Gen.Virol*. 2006; 87: 2127–2134,
10. Schmaljohn, C., Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis*. 1997; 3 (2): 95–104, doi: 10.3201/eid0302.970202.
11. Tamura M., Asada H., Kondo K., Tanishita O., Kurata T., Yamanishi K. Pathogenesis of Hantaan virus in mice. *J Gen Virol*. 1989; 70 (11): 2897-2906, doi: 10.1099/0022-1317-70-11-2897.