

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 578.833.29:578.23].083.2

Малкин Г.А., Дзагурова Т.К., Коротина Н.А., Баловнева М.В., Конюшко О.И., Соцкова С.Е., Ткаченко Е.А

ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ХАНТАВИРУСОВ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН, 142782, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, 27 км Киевского шоссе

Представлены результаты адаптации возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), штаммов вирусов Пуумала и Добрава, к размножению в культурах клеток обезьяньего происхождения – почки зеленой мартышки (Vero, 4647), селезенки зеленой мартышки (455), а также почки теленка (PT-1) и почки овцы (4184). Показано, что хантавирусы способны адаптироваться к репликации в новой клеточной системе, отличной по видовому происхождению от культуры Vero E6, в которой штаммы были изолированы. Этот факт демонстрирует неоднородность хантавирусной популяции, наличие в ней «квазивидов», способных узнавать и связываться с лигандами (b3-интегрины) другой видовой специфичности. Наиболее высокий урожай вируса, сравнимый с культурой Vero E6, обеспечивает культура Vero. В клетках Vero после 3–4 пассажей вирусы Пуумала и Добрава/Белград реплицируются также активно, как в перmissive культуре Vero E6, что предполагает использование культуры клеток Vero, разрешенной для производства иммунобиологических препаратов вводимых людям, в качестве субстрата при изготовлении вакцинных препаратов против ГЛПС.

Ключевые слова: хантавирусы; клеточные культуры; геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; вакцина.

Malkin G.A., Dzagurova T.K., Korotina N.A., Balovneva M.V., Konyushko O.I., Sotskova S.E., Tkachenko E.A.

FEATURES OF THE REPLICATION OF HANTAVIRUSES – PATHOGENS OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN CELL CULTURES OF DIFFERENT ORIGIN

M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 27@th km. of Kiev Highway, Leninsky District, Moscow Region, Russian Federation, 142782

There are presented results of the adaptation of pathogens of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus Puumala and Dobrava strains, to the reproduction in cell cultures of the simian origin – Green monkey kidney (Vero, 4647), Green monkey spleen (455), calf kidney (PT-1) and sheep kidney (4184). Hantaviruses were shown to be able to adapt to the replication in the new cellular system differing in species origin from the culture of Vero E6 origin in which the strains were isolated. This fact demonstrates the heterogeneity of hantavirus population, with the existence of «quasispecies» which can recognize and bind to ligands (b3 integrins) of the other species specificity. The highest yield of the virus, which is comparable with the culture of Vero E6, culture Vero provides. In Vero cells after 3–4 passages Puumala and Dobrava-Belgrade viruses replicate also actively as in a permissive culture Vero E6, that proposes the use of Vero culture cell allowed for the production of immunobiological drugs administered to people as a substrate in the delivery of vaccines against HFRS.

Key words: hantaviruses; cell cultures; HFRS; vaccine.

Хантавирусы, образующие одноименный род в составе обширного семейства буньявирусов, единственные в этом семействе нетрансмиссивные вирусы. 10 из 23 зарегистрированных в международном каталоге хантавирусов патогенны для человека и вызывают хантавирусные лихорадки с летальностью от 1–2 до 50%. На Евро-Азиатском континенте это вирусы Пуумала, Добрава, Хантаан и Сеул, вызывающие геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС), на американском континенте это в основном вирусы Син Нобр и Андес, вызывающие хантавирусный пульмональный синдром [1]. Естественными хозяевами хантавирусов являются грызуны и насекомоядные, в организме которых вирус длительное время коэволюционировал. Для них характерна видоспецифичность, т. е. наличие у каж-

дого генотипа или геноварианта лишь одного основного хозяина (вида или подвида), связанного с ним эволюционно, у которого хантавирусы вызывают хроническую бессимптомную инфекцию [2]. Вирус передается главным образом аэрогенным путем; вирусосодержащими являются экскреты мышевидных грызунов. Хантавирусы с трудом адаптируются к размножению в организме лабораторных животных, а также в клеточных культурах, что, вероятно, объясняет более чем тридцатилетний период безуспешных попыток изолировать возбудитель ГЛПС, вирусная природа которого уже была доказана [3]. Лабораторная модель хантавирусной инфекции известна только для вируса Андес, это сирийские хомячки, у которых инфекция протекает летально и симптоматически напоминает течение этой инфекции у человека [4]. Размножение хантавирусов Хантаан и Сеул в лабораторных условиях поддерживают новорожденные белые мыши, вирусов Пуумала и Син Номбр – сирийские хомячки и монгольские песчанки. Возможность использования клеточных культур для культивирования хантавирусов стала

Для корреспонденции (correspondens to): Малкин Геннадий Андреевич, мл. науч. сотр. лаб. геморрагических лихорадок ФГБУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова» РАМН, e-mail: centrqlps@rambler.ru, тел. 8 (498) 8419094

активно изучаться после успешной адаптации вируса Хантаан, изолированного на лабораторных мышах, к культуре клеток карциномы легких человека, A549 [5]. Впоследствии для изучения различных свойств хантавирусов, в том числе патогенеза хантавирусных инфекций, а также при разработке инактивированных вакцин были использованы как первичные клеточные культуры: клетки эндотелия человека [6], эндотелиальные клетки пупочной вены человека [7], клетки перитонеального экссудата и макрофаги крысы, макрофаги человека [8], клетки почки человека [9], клетки почки монгольской песчанки, клетки почки золотистого хомячка [10], так и перевиваемые линии клеток, полученные из органов человека, в том числе опухолевого происхождения: легкого (WI-38, A-427, CCD-11Lu), почки (A-704), печени (Hep G2), глотки (Detroit 562), подчелюстных желез (A-253) [9], клетки почек обезьян циномольтус (CV1), почек сирийского хомяка (BHK21), лимфобластомы доменной мыши (P388D1) [11].

Несмотря на многочисленные исследования, подбор клеточной культуры пригодной в качестве субстрата для производства вакцин против ГЛПС остается одной из актуальных проблем. К настоящему времени инактивированные хантавирусные вакцины производятся в Китае, КНДР и Южной Корее на основе вирусов Хантаан и Сеул, но они не обладают защитным действием против вируса Пуумала – основного возбудителя ГЛПС у жителей европейской части России, на которую приходится более 98% всей заболеваемости, регистрируемой в России. В середине 1990-х годов совместно с южно-корейскими исследователями нами была разработана технология изготовления моновалентной (против вируса Пуумала) и комбинированной (против вирусов Пуумала и Хантаан) вакцин на основе субстрата мозговой ткани сирийских хомячков. Однако мозговые вакцины не могут удовлетворять в полной мере современным национальным и международным требованиям, предъявляемым к медицинским иммунобиологическим препаратам, вводимым людям. Трудности с разработкой культуральной вакцины против хантавируса Пуумала связаны с ограниченным выбором чувствительных к размножению этого вируса клеточных культур и низкого уровня репродукцией вируса.

В настоящей работе представлены результаты адаптации штаммов вирусов – возбудителей ГЛПС к размножению в перевиваемых культурах клеток различного происхождения в попытке найти клеточную систему, обеспечивающую получение высокоактивного вирусного субстрата при производстве вакцины против ГЛПС, разработка которой активно ведется в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН.

Материалы и методы

Клетки: Vero – (ATCC No.CCL-81) перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки; Vero E6 – (ATCC No. CRL-1586) клон культуры Vero, отлича-

ется от исходной определенной степенью контактной ингибиции роста; 4647 (73-й пассаж) – линия гетероплоидных клеток почки взрослой зеленой мартышки; 455 (56-й пассаж) – линия перевиваемых клеток селезенки взрослой зеленой мартышки; 4184 (81-й пассаж) – линия перевиваемых клеток почки эмбриона овцы; ПТ-1 (75-й пассаж) – перевиваемая культура клеток почки теленка. Культуры клеток 4647, 455, 4184 и ПТ-1 были получены и охарактеризованы в ИПВЭ им. М.П. Чумакова Л.Л. Мироновой и соавт. [12].

Вирусы: Пуумала, штамм К27/Уфа-85; Добрава/Белград (далее вирус Добрава), штамм Ar1584/Сочи-01, штамм ЕАТ/Липецк-07.

Иммунные сыворотки больных и реконвалесцентов ГЛПС из коллекции лаборатории геморрагических лихорадок.

Вирусспецифический антиген в инфицированных клетках выявляли с помощью непрямого МФА [13]. Суспензию инфицированных клеток (450–550 тыс. кл/мл) вносили по 0,005 мл в лунки предметных стекол с тефлоновым покрытием. После высушивания клетки фиксировали охлажденным ацетоном. На антигенные препараты наносили соответствующие референс-сыворотки, содержащие антитела к хантавирусам в разведениях, начиная с 1:64 и заканчивая разведением, соответствующим титру сыворотки, а также нормальную сыворотку, не содержащую антител к хантавирусам, в разведениях с 1:16–1:64. Препараты помещали во влажную камеру и инкубировали при $37 \pm 1^\circ \text{C}$ в течение 30 мин после чего трехкратно отмывали физиологическим раствором (0,85% NaCl), промывали дистиллированной водой, высушивали и вносили в лунки с антигеном антивидовые антитела, меченные ФИТЦ. После инкубирования при $37 + 1^\circ \text{C}$ в течение 30 мин стекла промывали, высушивали и исследовали с помощью люминесцентного микроскопа, используя водно-иммерсионный объектив $\times 65$.

В культуральной жидкости (КЖ) и лизате клеток (КЛ) вирусспецифический антиген определяли иммуноферментным методом (ИФА), используя тест-систему Хантагност производства ФГУП “Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова”, согласно инструкции производителя, а также метод ИФА для детекции антигенов на основе моноклональных антител (мАТ) – тест-систему “ХАНТА-N” [14]. В лунки нечетных рядов панели (Costar) #9018) вносили по 100 мкл IgG (мАТ ДОБ, клон F1, или мАТ ПУУ, клон D4) в концентрации 1–3 мкг/мл, в четные ряды – мышинные IgG, не имеющие специфичности по отношению к хантавирусам; после 18 ч контакта при 4°C вносили по 100 мкл 2% БСА и через 1 ч контакта при комнатной температуре лунки промывали, вносили исследуемый образец в двукратных разведениях в ИФА-буфере (PBS + 0,1% BSA + 0,01% Твин-20) по 50 мкл на лунку. После 18 ч контакта при 4°C панель промыв-

вали и вносили по 50 мкл на лунку IgG (ДОБ, клон А4), меченные пероксидазой хрена. После контакта (1 ч 37°C) панель промывали, вносили индикатор – тетраметилбензидин (Sigma № Т8665) по 100 мкл и выдерживали при комнатной температуре в течение 15–20 мин. После остановки реакции 2М серной кислотой фотометрировали лунки на приборе Multiskan (длина волны 450 нм). Положительной считали пробу, для которой отношение оптической плотности в лунке со специфическим иммуноглобулином превышало показатель оптической плотности с нормальным иммуноглобулином в 2,1 раза (индекс Р/Н).

Индикацию вируса осуществляли методом титрования фокус-образующих единиц (ФОЕ) [13]. Монослой клеток VERO-E6, выращенных в 24-луночных панелях (Costar, 3524), заражали десятикратными разведениями вируса. После контакта с клетками при 37°C в течение 1 ч инокулят удаляли и вносили метилцеллюлозное покрытие (Sigma). После инкубации при 37°C в течение 6–7 сут, полужидкое покрытие удаляли, клетки отмывали 0,85% раствором NaCl. Монослой клеток фиксировали 96% этиловым спиртом, после чего клетки трехкратно отмывали и вносили в лунки специфические антихантавирусные антитела. После контакта при 37°C в течение 60 мин клетки трехкратно по 5 мин отмывали и вносили в лунки меченный пероксидазой белок “А” (Sigma). После контакта в течение 60 мин при 37°C клетки трехкратно по 10 мин отмывали и вносили индикатор пероксидазы. В качестве субстрат-индикаторной системы применяли 0,05% диаминобензидин тетрагидрохлорид (Sigma) с добавлением 0,02% NiCl₂ (Sigma) и 0,01% H₂O₂. Через 15–20 мин лунки промывали проточной водой, подсушивали и проводили учет опыта. Подсчитывали количество инфицированных колоний клеток, выявляемых визуально в виде темно-серых пятен ФОЕ; титр вируса выражали в lg ФОЕ в 1 мл вносимого для инфицирования клеток образца.

Для выявления вирусной РНК применяли универсальную родоспецифическую гнездовую Pan-HantaL-PCR [15]. Для выделения вирусной РНК использовали культуральную жидкость и лизаты клеток инфицированных клеточных культур. В качестве лизирующего буфера использовали TRIZOL (Sigma) в соотношении 900 мкл реагента к 100 мкл образца. Выделение РНК проводили методом хлороформ-фенольной экстракции. К-ДНК получали обратной транскрипцией в смеси объемом 20 мкл, содержащей 4 мкл буфера (x 5) (Fermentas), 2 мкл 2,5М смеси трифосфатов (СибЭнзим), 2 мкл N6 праймера (СибЭнзим), 0,5 мкл обратной транскриптазы (Thermo Scientific Maxima Reverse Transcriptase, 200 е. а/мкл), 10 мкл раствора РНК. Образцы инкубировали при 25, 42 и 96°C в течение 10, 30 и 6 мин соответственно. Внешние праймеры: HAN-L1F: 5'-ATG TAY GTB AGT GCW GAT GC-3'; HAN-L1R: 5'-AAC CAD TCW GTY CCR TCA TC-3'. Внутренние праймеры (Nested): HAN-L2F: 5'-TGC WGA TGC HAC IAA RTG GTC-3'; HAN-L2R:

5'-GCR TCR TCW GAR TGR TGD GCA A-3'. Готовили смесь (20 мкл), содержащую: 2 мкл буфера (x 10) и 2 мкл 2,5М смеси трифосфатов (СибЭнзим), 2 мкл 50 мМ MgCl₂ (СибЭнзим), по 10 пМ каждого праймера, 2 мкл к-ДНК (или амплификата), 1 мкл Hot Start Taq ДНК полимеразы (1000 е.а., СибЭнзим). Амплификацию проводили в терцике (ДНК-Технология) с маслом (Helicon) в условиях: 95°C 15 мин, затем 40 (или 25 в случае NESTED) циклов по 30 с при 95°C, 45 с при 53°C, 45 с при 72°C, терминация 72°C 6 мин. Детекция амплификатов проводилась с помощью горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозе (Amresco) и ТБЕ-буфере. В качестве стандарта использовали GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder Unit Size 50 мкг (Fermentas).

Монослойные клеточные культуры, выращенные во флаконах 25 или 75 см², заражали соответствующим вирусом в объеме инокулята 1,0 или 2,0 мл с множественностью 0,1–0,5 ФОЕ/кл. В качестве сравнения служила культура Vero E6, в которой хантавирусные штаммы были изначально изолированы. Для полноценной адаптации к росту в клеточной системе, отличной от Vero E6, применяли метод пассирования хронически зараженной культуры, используемый при изоляции хантавирусных штаммов от естественных хозяев, а также пассажи лизатов инфицированных клеток. Пассаж зараженной культуры осуществляли через 14 дней (1–3-й пассажи), далее через 9–11 дней; в это же время проводили контроль зараженности клеток, а также инфекционного вируса в культуральной жидкости.

Результаты и обсуждение

Для выяснения степени чувствительности способов детекции размножения вируса в клеточных культурах было проведено сравнение методов выявления вирусного антигена по иммунофлюоресценции и ИФА, индикации инфекционного вируса по титрованию ФОЕ в культуральной жидкости и лизате клеток, а также определение вирусной РНК.

Полученные данные, обобщенные в таблице, показали, что для индикации размножения вируса

Индикация вируса Добrava, штамм Ap1584/Сочи-01 в культуре Vero E6

Часы после заражения	ДОБ/Сочи	ФОЕ	ИФА	ПЦР	МФА
24	КЛ	Отр.	Отр.	К/и	ед. кл.
48	КЛ	Отр.	Отр.	Отр.	10–15%
72	КЖ	3,1	Отр.	Отр.	
	КЛ	3,5	Отр.	Отр.	25–30%
96	КЖ	3,6	Отр.	+	
	КЛ	4	+	+	50–60%
120	КЖ	4,4	+	+	
	КЛ	4,6	+	+	75–80%
144	КЖ	4,7	+	+	
	КЛ	5,2	+	+	90–95%

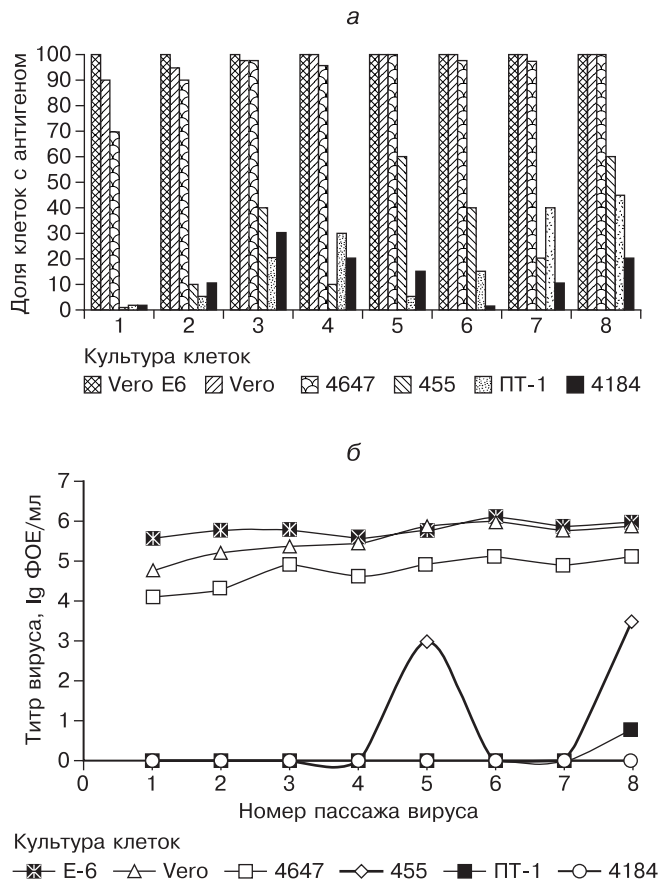


Рис. 1. Динамика накопления. *а* – внутриклеточного антигена вируса Пуумала; *б* – вируса Пуумала в культуральной жидкости. Здесь и на рис. 2 стрелками показано заражение монослоя культуры лизатом клеток предыдущего вирусного пассажа.

Добрава наиболее чувствительным является определение вирусного антигена в клетках методом иммунофлюоресценции. Антигенсодержащие клетки можно было наблюдать через 24 ч после заражения культуры, тогда как методом ИФА антиген обнаруживался спустя 96–120 ч после заражения. Вторым по чувствительности явился метод титрования вируса по ФОЕ: инфекционный вирус обнаруживался в КЖ и лизате КЛ культуры Vero E6 при зараженности более 25% клеток. Вирусная РНК определялась при титре вируса более 3,5 lg ФОЕ/мл. Похожие результаты были получены и для вируса Пуумала, штамм К27/Уфа-85 (результаты не приводятся). Исходя из этих данных, оценка чувствительности той или иной клеточной линии к размножению хантавирусов проводилась по результатам определения специфического антигена МФА и инфекционного вируса по выявлению ФОЕ как наиболее чувствительных и специфичных методов.

Результаты динамики накопления вирусного антигена в клетках и инфекционного вируса в культуральной жидкости исследуемых клеточных культур отражены на рис. 1, *а*, *б* (Пуумала, штамм К27/Уфа-85), 2, *а*, *б* (Добрава-Куркино, шт. ЕАТ/Липецк-07).

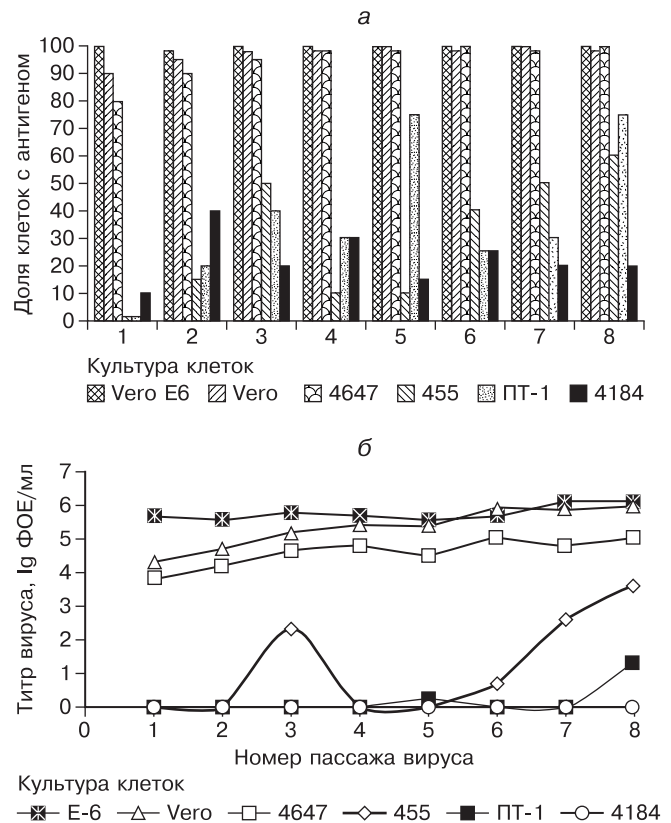


Рис. 2. Динамика накопления внутриклеточного антигена вируса Добрава-Куркино – *а*; *б* – вируса Добрава-Куркино в культуральной жидкости.

Наиболее успешно штаммы обоих хантавирусов адаптировались к размножению в культуре Vero: через 3–5 пассажей максимальные титры вирусов Пуумала и Добрава соответствовали таковым в культуре Vero E6 и составили 5,9–6,2 lg ФОЕ/мл. Этот результат был исключительно важен с точки зрения перспективы использования культуры Vero в качестве продуцента вакцины. В серии опытов по влиянию множественности заражения (МЗ) на накопление внеклеточного вируса было показано, что при МЗ 5–10 ФОЕ/кл максимальный выход вирусов Пуумала и Добрава в КЖ приходится на 5–6-е сутки после заражения, при более низкой МЗ смещается на 2–3 сут, а при МЗ ниже 0,001 титр вируса уже не достигает максимальных показателей за весь период наблюдения (36 дней). При МЗ 0,1–1 ФОЕ/кл урожай вируса Пуумала с титром $5,48 \pm 0,38$ – $5,62 \pm 0,72$ lg ФОЕ/мл можно получать в результате ежедневных сливов КЖ с 6-х по 11-е сутки после заражения; максимальный титр вируса регистрируется на 7–8-е сутки (рис. 3).

В культуре 4647, которая также получена из почки зеленой мартышки, после 2–3 пассажей как вируса Пуумала, так и Добрава, зараженность клеток соответствовала таковой в перmissive культуре, т. е. около 100%, однако титр вируса в культуральной жидкости на протяжении 8 последовательных

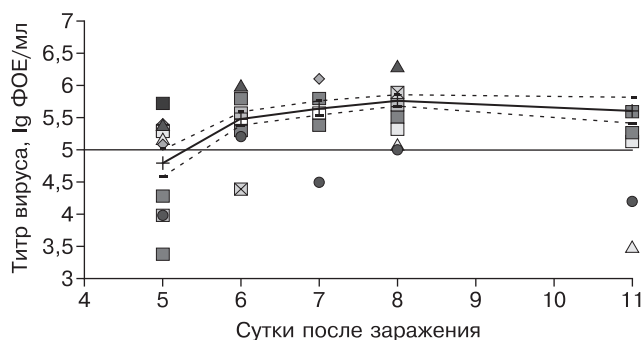


Рис. 3. Динамика накопления вируса Пуумала в КЖ клеток Vero при роллерном культивировании. Сборы КЖ с титром вируса $\geq 5,0$ лг ФОЕ/мл могут использоваться для производства цельновирионной инактивированной вакцины.

пассажей оставался на 0,8–1,3 лг ФОЕ/мл ниже, чем в культуре Vero E6. Таким образом, отечественная культура клеток зеленой мартышки, сертифицированная для производства вакцин, оказалась менее чувствительной к размножению хантавирусов – возбудителей ГЛПС по сравнению с культурами Vero и Vero E6.

Еще более низкий уровень размножения вирусов Пуумала и Добрава отмечен в культуре клеток селезенки взрослой зеленой мартышки – 455. Максимальная зараженность клеток как вирусом Пуумала, так и Добрава не превысила 60%, а титр вируса не достигал 4 лг ФОЕ/мл через 8 пассажей в этой культуре. Следует отметить, что на 1-м пассаже обоих вирусов зараженными были лишь единичные клетки, тогда как в культуре 4647 уже на первом пассаже зараженность клеток составляла около 70%. На 2-м пассаже клеток селезенки зеленой мартышки – 455, инфицированных вирусами Пуумала и Добрава, антигенсодержащими были около 40–50% клеток, однако интенсивность свечения была слабой, вирус в культуральной жидкости не определялся. После заражения монослоя культуры 455 лизатом клеток с 40% содержанием антигена вируса Пуумала (4-й пассаж), зараженностью клеток составила на 11-е сутки только 10%, однако уже в следующем пассаже этих клеток антигенсодержащими были 60% с выходом вируса в КЖ с титром 2,3 лг ФОЕ/мл. В дальнейшем на 7-м и 8-м пассажах зараженность клеток не превысила 60%, а титр внеклеточного вируса – 3,2 лг ФОЕ/мл. Динамика накопления размножения вируса Добрава в культуре 455 характеризовалась колебанием количества антигенсодержащих клеток со 2-го по 8-й пассаж между 40–60%, при этом инфекционный вирус в КЖ определялся на последних двух пассажах с максимальным титром 3,6 лг ФОЕ/мл.

В культуре клеток почки эмбриона овцы, 4184, оба хантавируса размножались слабо на протяжении 8 последовательных пассажей как инфицированной культуры, так и лизатов инфицированных клеток. Количество клеток, инфицированных вирусом Пуумала, не превышало 20%, вирусом Добрава – 40% со

слабой интенсивностью свечения антигена; инфекционный вирус в КЖ оставался на неопределяемом уровне.

В культуре клеток почки телянка, ПТ-1, максимальная зараженность вирусом Пуумала составила 45%, титр вируса в КЖ – около 2 лг ФОЕ/мл; максимальная зараженность вирусом Добрава составила 75%, титр вируса в КЖ – 2,3 лг ФОЕ/мл. В отличие от культуры 455 и, особенно, 4184, в клетках ПТ-1, инфицированных как вирусом Пуумала, так и Добрава (оба варианта), антиген интенсивно накапливался, что выражалось ярким гранулярным свечением в цитоплазме при исследовании МФА с гомологичными сыворотками. Способность культуры ПТ-1 интенсивно накапливать внутриклеточный антиген была использована для приготовления антигенных слайдов. Эти антигенные препараты были применены для выявления антихантавирусных флюоресцирующих антител при контроле специфической иммуногенной активности вакцинных препаратов. Использование клеток необезьяньего происхождения в качестве антигенного субстрата позволяет избежать неспецифических реакций, обусловленных иммунным ответом на возможное присутствие в вакцинном препарате белков цитоскелета (в данном случае субстратом вакцины являлись клетки Vero).

Как было ранее показано на модели эндотелиальных клеток человека и подтверждено на модели эндотелиоцитов аорты телянка, патогенные хантавирусы используют для проникновения в клетку b3-интегрины [16, 17]. Последние присутствуют во всех клетках организма позвоночных животных, но обладают видовой специфичностью. Вероятно, b3-интегрины не всех животных способны связываться с хантавирусами ввиду их естественных отличий, что определяет видовой барьер распространения хантавирусных инфекций. Нами впервые показана возможность адаптации патогенных хантавирусов Пуумала и Добрава к размножению в клетках перевиваемых линий почки овцы и почки телянка. При высокой множественности заражения, обеспечивающего на 3-и сутки почти 100% зараженность перmissive культур Vero E6, зараженность клеток ПТ-1 и 4184 вирусом Пуумала была представлена единичными клетками к 14-му дню, вирусом Добрава – единичными клетками и 10% клеток соответственно. Несмотря на то, что общая зараженность клеток и выход инфекционного вируса в КЖ не достигли показателей перmissive культуры даже через 8 последовательных пассажей вируса, факт репликации этих вирусов в новой системе “хозяина” открывает возможности дальнейшего изучения вопросов, связанных с преодолением видового барьера, вирусной трансмиссии и экологии хантавирусов. Эти результаты косвенно подтверждают факт неоднородности хантавирусной популяции, наличия в ней “квазивидов”, способных узнавать и связываться с лигандами (b3-интегрины) другой видовой специфичности.

Проведенные нами исследования демонстрируют большую консервативность вируса Пуумала сравнительно с вирусом Добрава при адаптации к размножению в другой клеточной культуре и подтверждают наши предыдущие наблюдения о том, что хантавирусы, эволюционно связанные с грызунами подсемейства Хомяковых (в том числе вирус Пуумала), менее эффективно выделяются в клеточных культурах по сравнению с вирусами, ассоциированными с грызунами подсемейства мышинных (Хантаан, Сеул и Добрава) [18].

Важным положительным результатом исследований явилась успешная репликация в культуре Vero штаммов вирусов Пуумала и Добрава: после 3–4 последовательных пассажей инфицированных клеток титр вируса в КЖ этой культуры соответствовал таковому в культуре Vero Е6. Известно, что патогенные хантавирусы подавляют экспрессию α -интерферона и МхА белка в первые 48 ч после инфекции [19], тем не менее, наличие в культурах Vero Е6 и Vero дефекта гена – индуктора α -интерферона [20], по-видимому, благоприятно сказывается на размножении патогенных хантавирусов в этих культурах. Данные динамики накопления вируса Пуумала в КЖ Vero при роллерном культивировании указывают на возможность ежедневных сборов КЖ в качестве вакцинного полуфабриката с 6-х по 11-е сутки.

Заключение

Впервые установлена возможность адаптации патогенных хантавирусов Пуумала и Добрава, изолированных в культуре клеток Vero Е6, к размножению в перевиваемых клетках почки овцы и почки теленка.

Выявлена большая консервативность вируса Пуумала сравнительно с вирусом Добрава при адаптации к размножению в клеточной культуре, отличной по хозяину происхождения от Vero Е6, в которой штаммы этих вирусов были изолированы.

Показано, что после 3–4 пассажей культура Vero поддерживает размножение хантавирусов Пуумала и Добрава на уровне перmissive клеточной культуры Vero Е6. Определены динамика накопления вирусов Пуумала и Добрава в культуре клеток Vero при различной множественности заражения и оптимальные сроки сбора вирусного урожая.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Ткаченко П.Е. Хантавирусы: экология, молекулярная биология, морфология, патогенез и диагностика хантавирусных инфекций. Молекулярная медицина. 2009; 5: 36–41.
2. Plyusnin A., Morzunov S.P. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001; 256: 47–75.
3. Смородинцев А.А., Альтшуллер И.С., Дунаевский М.И. и др. Этиология и клиника геморрагического нефрозо-нефрита. М.: ВИЭМ, 1944.
4. Hooper J., Larsen T., Custer D. et al. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology.* 2001; 289: 6–14.
5. French G.R., Foulke R.S., Brand O.A., et al. Korean hemorrhagic fever: propagation of the etiologic agent in a cell line of human origin. *Science.* 1981; 211: 1046–8.

6. Pensiero M.N., Sharefkin J.B., Dieffenbach C.W., et al. Hantaan virus infection of human endothelial cells. *J. Virol.* 1992; 66: 5929–36.
7. Yanagihara R., Silverman D.J. Experimental infection of human vascular endothelial cells by pathogenic and nonpathogenic hantaviruses. *Arch. Virol.* 1990; 111: 281–6.
8. Nagai T., Tanishita O., Takahashi Y. et al. Isolation of hemorrhagic fever with renal syndrome virus from leukocytes of rats and virus replication in cultures of rat and human macrophages. *J. Gen. Virol.* 1985; 66: 1271–8.
9. Temonen M., Vapalahti O., Holthofer H. et al. Susceptibility of human cells to Puumala virus infection. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 515–8.
10. Song G., Huang Y.C., Hang C.S. Preliminary human trial of inactivated golden hamster kidney cell vaccine against HFRS. *Vaccine.* 1992; 10: 214–6.
11. Ogino M., Yoshimatsu K., Ebihara H. et al. Cell fusion activities of hantaan virus envelope glycoproteins. *J. Virology.* 2004; 78 (19): 10776–82.
12. Миронова Л.Л., Попова В.Д., Конюшко О.И. и др. Опыт создания банка авторских линий перевиваемых клеток и их применение в вирусологической практике. Биотехнология. 2000; 6: 41–7.
13. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Башкирцев В.Н. и др. Выделение и идентификация штаммов хантавирусов-возбудителей ГЛПС в европейской части России. В кн.: Медицинская вирусология. М.; 2008; 26: 142–50.
14. Дзагурова Т.К., Солопова О.Н., Свешников П.Г. и др. Разработка иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител для определения специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Вопросы вирусологии. 2013; 58 (1): 40–4.
15. Kruger D., Klempa B. Molecular detection of human viral pathogens. CRC Press; 2012: 631–38.
16. Gavrillovskaya I.N., Brown E.J., Ginsberg M.H. et al. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by b3 integrins. *J. Virol.* 1999; 73 (5): 3951–9.
17. Muranyi W., Kehm R., Bahr U. et al. Bovine aortic endothelial cells are susceptible to hantavirus infection; a new aspect in hantavirus ecology. *Virology.* 2004; 318: 112–22.
18. Иванов Л.И., Здановская Н.И., Дзагурова Т.К. и др. Адаптационная способность хантавирусов при изоляции на культуре клеток VERO-E6 в зависимости от вида экологического хозяина. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2000; 4: 22–5.
19. Kraus A.A., Raftery M.J., Giese T. et al. Differential antiviral response of endothelial cells after infection with pathogenic and non-pathogenic hantaviruses. *J. Virology.* 2004; 78 (12): 6143–50.
20. Desmyter J., Melnick J.L., Rawls W.E. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of african green monkey kidney cells (Vero). *J. Virology.* 1968; 2 (10): 955–61.

REFERENCES

1. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Tkachenko P.E. Hantaviruses: ecology, molecular biology, morphology, pathogenesis and diagnostics of hantaviral infections. *Molec. med.* 2009; 5: 36–41. (in Russian)
2. Plyusnin A., Morzunov S.P. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001; 256: 47–75.
3. Smorodincev A.A., Altshuller I.S., Dunaevsky M.I. et al. Etiology and clinical hemorrhagic nephroso-nephritis. M.: VIEM; 1944. (in Russian)
4. Hooper J., Larsen T., Custer D. et al. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology.* 2001; 289: 6–14.
5. French G.R., Foulke R.S., Brand O.A., et al. Korean hemorrhagic fever: propagation of the etiologic agent in a cell line of human origin. *Science.* 1981; 211: 1046–8.

6. Pensiero M.N., Sharefkin J.B., Dieffenbach C.W., et al. Hantaan virus infection of human endothelial cells. *J. Virol.* 1992; 66: 5929–36.
7. Yanagihara R., Silverman D.J. Experimental infection of human vascular endothelial cells by pathogenic and nonpathogenic hantaviruses. *Arch. Virol.* 1990; 111: 281–6.
8. Nagai T., Tanishita O., Takahashi Y. et al. Isolation of haemorrhagic fever with renal syndrome virus from leukocytes of rats and virus replication in cultures of rat and human macrophages. *J. Gen. Virol.* 1985; 66: 1271–8.
9. Temonen M., Vapalahti O., Holthofer H. et al. Susceptibility of human cells to Puumala virus infection. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 515–8.
10. Song G., Huang Y.C., Hang C.S. Preliminary human trial of inactivated golden hamster kidney cell vaccine against HFRS. *Vaccine.* 1992; 10: 214–6.
11. Ogino M., Yoshimatsu K., Ebihara H. et al. Cell fusion activities of hantaan virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* 2004; 78 (19): 10776–82.
12. Mironova L.L., Popova V.D., Konushko O.I., et al. Creating of bank of copyright transplanted cells lines and their use in virology practice. *Biotech.* 2000; 6: 41–7. (in Russian)
13. Dzagurova T.K., Tkachenko E.A., Bashkircev V.N., et al. Isolation and identification of strains of hantavirus causative HFRS in the European part of Russia. In: *Med. Vir.* 2008; 26: 142–50. (in Russian)
14. Dzagurova T.K., Solopova O.N., Sveshnikov P.G., Korotina N.A., Balovneva M.V., Leonovich O.A., Varlamov N.E., Malkin G.A. et al. Development of ELISA on the basis of monoclonal antibodies for detecting specific activity of the vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Vopr. Virusol.* 2013; 58 (1): 40–4. (in Russian)
15. Kruger D., Klempa B. *Molecular detection of human viral pathogens.* CRC Press; 2012: 631–8.
16. Gavrilovskaya I.N., Brown E.J., Ginsberg M.H. et al. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by b3 integrins. *J. Virology.* 1999; 73 (5): 3951–9.
17. Muranyi W., Kehm R., Bahr U. et al. Bovine aortic endothelial cells are susceptible to hantavirus infection; a new aspect in hantavirus ecology. *Virology.* 2004; 318: 112–22.
18. Ivanov L.I., Zdanovskaia N.I., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. Adaptive property of hantaviruses during their isolation from cultured VERO-E6 cells in relation to the type of the ecological host. *Med. Parazitol.* 2000; 4: 22–5. (in Russian)
19. Kraus A.A., Raftery M.J., Giese T. et al. Differential antiviral response of endothelial cells after infection with pathogenic and non-pathogenic hantaviruses. *J. Virology.* 2004; 78 (12): 6143–50.
20. Desmyter J., Melnick J. L., Rawls W.E. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of african green monkey kidney cells (Vero). *J. Virology.* 1968; 2 (10): 955–61.

Поступила 26.03.14

Received 26.03.14

Сведения об авторах:

Дзагурова Тамара Казбековна, канд. мед. наук, зав. лаб. геморрагических лихорадок, ФГБУ “ИПВЭ им. М.П. Чумакова” РАМН, e-mail: centrglps@rambler.ru; **Коротина Наталья Александровна**, науч. сотр. лаб. геморрагических лихорадок ФГБУ “ИПВЭ им. М.П. Чумакова” РАМН, e-mail: centrglps@rambler.ru; **Баловнева Мария Владимировна**, канд. мед. наук., ст. науч. сотр. лаб. геморрагических лихорадок ФГБУ “ИПВЭ им. М.П. Чумакова” РАМН, e-mail: centrglps@rambler.ru; **Конюшко Ольга Ивановна**, канд. биол. наук., ст. науч. сотр. лаб. иммунологии и культур тканей ФГБУ “ИПВЭ им. М.П. Чумакова” РАМН; e-mail: polcells@yandex.ru; **Соцкова Светлана Евгеньевна**, руководитель отдела биологической безопасности ФГБУ “ИПВЭ им. М.П. Чумакова” РАМН; e-mail: se-sotskova@mail.ru; **Ткаченко Евгений Александрович**, доктор мед. наук, проф., зам. директора по науке ФГБУ “ИПВЭ им. М.П. Чумакова” РАМН; e-mail: evgeniytkach@mtu-net.ru