

Апекина Н.С.<sup>1</sup>, Бернштейн А.Д.<sup>1</sup>, Демина В.Т.<sup>2</sup>, Гавриловская И.Н.<sup>3</sup>

## Варианты иммунореактивности и течения инфекции у рыжей полевки (*Myodes glareolus*) при экспериментальном заражении хантавирусом Puumala (PUUV)

<sup>1</sup>ФГБУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, РАМН, 142782, Москва; <sup>2</sup>ООО «БИМГ», 103379, Москва; <sup>3</sup>Государственный университет Нью-Йорка в Стони Брук, отдел молекулярной генетики и микробиологии, 11794, США.

При длительном изучении инфекционного процесса у рыжих полевок (*Myodes glareolus*), экспериментально зараженных штаммом Казань 6С.г хантавируса Puumala (PUUV), выявлены три группы особей, отличающихся по иммунореактивности и интенсивности накопления вирусного антигена в органах. Наличие тесной связи между этими параметрами предполагает существование разных механизмов персистенции вируса и вариантов течения инфекции в организме хозяина.

Ключевые слова: хантавирус Puumala; рыжая полевка; иммунореактивность.

### Variants of the Immunoreactivity and Infectious Process in Bank Vole (*Myodes glareolus*) Experimentally Infected with the Hantavirus Puumala (PUUV)

Apekina N.S.<sup>1</sup>, Bernshtein A.D.<sup>1</sup>, Demina V.T.<sup>2</sup>, Gavrilovskaya I.N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>BIMG Ltd., Moscow, Russia; <sup>3</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology, State University of New York at Stony Brook, New York, USA

As a result of a longitudinal study of the Puumala hantavirus (PUUV) in the experimentally infected bank voles (*Myodes glareolus*), we revealed three groups of the voles differing in the immunoreactivity and viral antigen concentration in the organs. The close correlation between these parameters suggested the existence of various mechanisms of the hantavirus persistence in the host.

Key words: Puumala hantavirus; bank vole; immunoreactivity.

Род *Hantavirus* (семейство Bunyaviridae) насчитывает более 50 хантавирусов, многие из которых патогенны для человека и вызывают геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) на территории Евразии и хантавирусный пульмонарный синдром в странах Нового Света [1–3]. Природными резервуарами всех патогенных для людей хантавирусов служат грызуны из семейств: мышьиные (Muridae) и хомяковые (Cricetidae). Каждый вирус имеет, как правило, одного хозяина, связанного с ним эволюционно, и относится к определенному генотипу [4]. В европейской части ареала наиболее широко распространен вирус Puumala (PUUV), основной хозяин которого – рыжая полевка (*Myodes glareolus*) [5, 6]. У большинства животных в течение первого месяца после заражения развивается острая, бессимптомная инфекция, не влияющая на их жизнедеятельность, которая сопровождается формированием нестерильного иммунитета и интенсивным выделением вируса с экскретами во внешнюю среду [6–8]. В этот период инфицированные животные эпидемически наиболее опасны. В дальнейшем у грызунов, в отличие от острого течения ГЛПС у человека, несмотря на присутствие нейтрализующих антител, формируется хроническая персистирующая инфекция [8–10]. Центральная роль в ее патогенезе отводится не столько прямому воздействию хантавирусов на клетки, так как они не оказывают цитопатического эффекта, сколько многочисленным иммунологическим феноменам [11, 12].

Многие вопросы взаимоотношений хантавирусов с хозяевами еще мало изучены. В наших предыдущих публикациях были приведены сведения о накоплении PUUV и вирусного антигена в органах рыжей полевки в разные сроки после заражения; горизонтальной передаче вируса; врожденном и приобретенном иммунитете у этих грызунов в природных и лабораторных условиях [5, 7, 8, 13]. В настоящем сообщении представлены ранее не опубликованные данные длительных экспериментальных исследований (1987–1988 гг.) по изуче-

нию гуморального иммунитета у зараженных рыжих полевок и его связи с накоплением вирусного антигена в органах.

### Материалы и методы

**Вирус.** Для заражения использовали PUUV, штамм Казань 6С.г., 39 пассаж, изолированный из легких рыжей полевки [7].

**Животные.** Моделью служили рыжие полевки лабораторной линии нашего института [14]. 162 полевок обоего пола (86♀ и 76♂) в возрасте 3–16 мес, предварительно проверенные на отсутствие антител (Ат) к хантавирусам, были заражены PUUV внутримышечно по 100 ИД<sub>50</sub>/0,3мл. Титрование вируса проводили методом конечных разведений путем заражения лабораторных полевок; титры рассчитывали по методу Рида и Минча. Инфекционная доза (ИД<sub>50</sub>) вызывала образование антигена и / или Ат к PUUV у 50% особей. Полевки содержались по 10–12 особей в отдельных клетках от 5 дней до 14 мес. На 5, 10, 14, 20, 30-е сутки после заражения и далее ежемесячно у животных прижизненно брали кровь из ретроорбитального синуса (~0,1 мл), разводили в 4 раза фосфатным буфером (рН 7,4) и исследовали на наличие специфических Ат непрямым методом флюоресцирующих антител (НМФА) по ранее описанной методике [7]. Всего исследовали 1329 сывороток, из которых 1209 сывороток от 116 особей, обследованных в динамике не менее 5 раз, использовали для сравнительного анализа иммунного статуса инфицированных полевок. Для выявления антигена (АГ) в вышеуказанные сроки, по 5–7 полевок умерщвляли эфиром и готовили 10% суспензию тканей на среде Игла (исходный титр обозначили как неразведенный). Индикацию Аг в крови, экскретах и органах и последующее его титрование проводили прямым иммуноферментным методом (ИФМ) по ранее описанной методике [7]. По уровню накопления АГ оценивали интенсивность течения инфекции в организме полевок [5, 8].

Концентрации Ат оценивали в показателях среднегеоме-

Для корреспонденции: Апекина Наталья Сергеевна, bamleo@yandex.ru

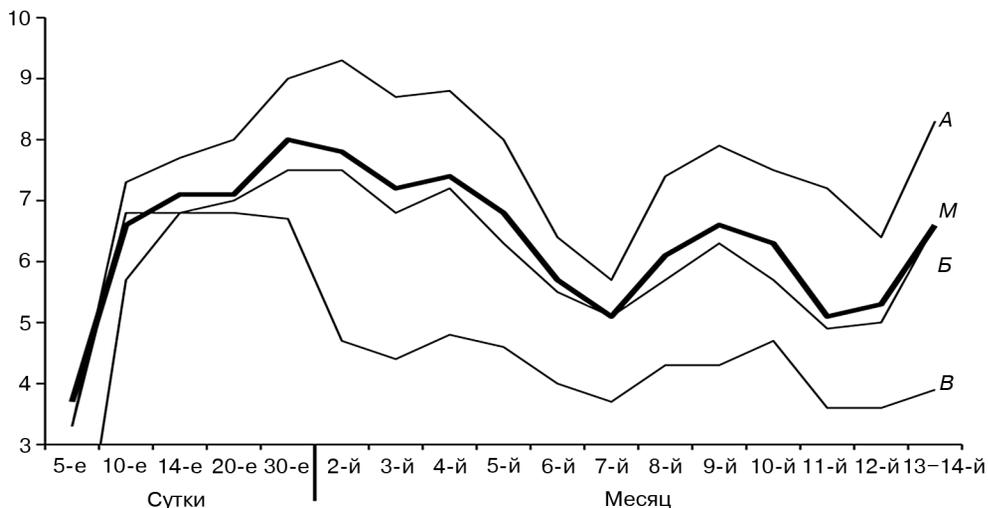


Рис. 1. Изменение в динамике гуморального иммунитета у рыжих полевков трех иммунологических групп после экспериментального заражения PUUV (штамм Казань 6 С. г.).

Группы полевков с разной иммунореактивностью: А – высокой; Б – средней, В – низкой ( $n = 55$ ;  $n = 35$ ;  $n = 26$  соответственно); М – средние показатели. По вертикали – СГТ АТ ( $-\log_2$ ). Здесь и на рис. 2: по горизонтали – сутки и месяцы после заражения.

трических титров (СГТ  $-\log_2$ ). При статистической обработке материала использовали стандартные методы расчета средних величин и их ошибок. Уровень достоверности составлял не менее 95%.

### Результаты

**Гуморальный иммунитет. Динамика и групповые различия.** Сравнительный анализ показателей иммунитета 116 полевков обоего пола, обследованных многократно, позволил выделить три группы особей с разным уровнем иммунного ответа: А – высоким, Б – средним и В – низким (рис. 1). Периодичность, прослеживаемая в динамике иммуногенеза во всех группах, в общих чертах была сходной: 5–30-е сутки – нарастание уровня АТ; 2–4-й месяц – относительная стабильность; 5–7 и 11–12-й месяц – снижение уровня АТ; 8–10 и 13–14-й месяц – повторная активизация иммуногенеза (табл. 1). При этом, характер процесса у особей с разным иммунным статусом имел свои особенности. В течение опыта, начиная с 10-х суток, группы весьма существенно отличались между собой по уровню и диапазону колебаний СГТ АТ ( $p < 0,001$ ). У полевков группы А отмечен ускоренный и интенсивный тип иммунного ответа с наиболее ярко выраженной периодичностью. Уже на 10-е сутки после заражения больше половины особей этой группы имели АТ, тогда как в группе В – меньше трети ( $p < 0,01$ ). Сероконверсия у 50% полевков с высокой иммунореактивностью продолжалась еще в течение 2-го месяца; у 1/3 зверьков стабильно высокие титры АТ (1:640–2560) сохранялись на 3–4-й, а у единичных – даже на 5–6-й месяц после заражения. Напротив, сравнительно интенсивное антителообразование в группе В происходило только в 1-й период, а начиная со 2-го месяца большинство особей имели устойчиво низкий иммунный статус. Титры АТ у отдельных полевков периодически снижались даже ниже порогового уровня ( $< 1:10$ ), и в течение 5–7 и 12-го месяца доля таких зверьков достигала более чем 20–40%. Небольшие подъемы уровня АТ на 4 и 8–10-й месяц отмечены только у единичных особей. Полевки группы Б по всем параметрам занимали промежуточное положение. При сходстве динамики иммуногенеза, они существенно отлича-

лись от полевков группы А интенсивностью процесса во все сроки наблюдения, за исключением 10–14 дней. Показатели иммунитета у них были существенно ниже, чем в группе А, как при минимуме на 7-й месяц ( $5,1 \pm 0,1$  и  $5,7 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ), так и при повторной активизации иммуногенеза на 8–10-й месяц ( $p < 0,001$ ) (см. табл. 1). Иммунный минимум у большинства особей этих групп приходился на 6-й и/или 7-й месяц. У полевков групп Б и В титры АТ к концу наблюдения (в течение 11–12 и 13–14-го месяца) достоверно не отличались.

Во всех группах присутствовали взрослые особи разного пола. В среднем, показатели иммунитета у самок, большинство из которых принесло потомство, были выше, чем у половозрелых самцов ( $6,9 \pm 0,09$  и  $6,6 \pm 0,08$ ;  $p = 0,01$ ), однако значимые различия отмечены только в неко-

торые сроки: в группе В на 2-й месяц ( $p < 0,01$ ), а в группах Б и А на 9-й и 10-й месяц соответственно ( $p < 0,01$ ). Связи уровня иммунного ответа с возрастом мы не обнаружили.

**Накопление вирусного антигена.** АГ впервые выявили на 5-е сутки в крови (4,3% из 162 особей) и кале (28,6% из 70), а на 10-е сутки в органах. В течение нескольких месяцев после заражения антигенемия имела транзиторный характер и с 10-х суток по 7-й месяц зафиксирована у 4,5% из 157 особей. Повышенный уровень АГ в крови наблюдали только в период повторной активизации иммуногенеза (27,4% из 73). Всего в ходе эксперимента его обнаружили у 36 зараженных полевков и у половины из них – на 8–10-й месяц, а до и после – лишь у единичных особей.

При сравнении уровней накопления АГ в органах полевков с разной иммунореактивностью мы установили, что у особей с высоким иммунным статусом АГ присутствовал чаще и в более высоких концентрациях, чем у полевков двух других групп (табл. 2). По результатам обследования всех органов, доля особей с АГ в группе А была достоверно выше, чем в группе В ( $p < 0,05$ ). Наиболее значимые различия отмечены в частоте его присутствия в легких и головном мозге ( $p <$

Таблица 1

Показатели гуморального иммунитета СГТ АТ и число особей с АГ в легких рыжих полевков трех иммунологических групп в разные периоды после экспериментального заражения PUUV (штамм Казань 6 С. г.)

Период после заражения	Обследовано сывороток в группах А, Б, В	А		Б		В	
		СГТ АТ	АГ	СГТ АТ	АГ	СГТ АТ	АГ
Сутки: 5–30-е	165:105:78	$8,2 \pm 0,2$	Н. и.	$7,2 \pm 0,2$	Н. и.	$6,4 \pm 0,2$	Н. и.
Месяцы:							
2–4-й	149:100:75	$8,9 \pm 0,1$	6/11	$7,3 \pm 0,1$	0/5	$4,7 \pm 0,1$	1/3
5–7-й	113:78:64	$6,8 \pm 0,1$	5/9	$5,7 \pm 0,1$	2/6	$4,1 \pm 0,1$	0/4
8–10-й	82:54:50	$7,7 \pm 0,2$	7/14	$5,9 \pm 0,2$	2/12	$4,5 \pm 0,2$	1/3
11–12-й	31:17:27	$6,3 \pm 0,2$	3/9	$5,0 \pm 0,3$	1/4	$3,7 \pm 0,1$	0/10
13–14-й	8:7:7	$8,3 \pm 0,3$	3/7	$6,5 \pm 0,7$	0/5	$4,3 \pm 0,4$	0/5
Всего ...	548:361:300	$7,9 \pm 0,1$	24/50	$6,5 \pm 0,1$	5/32	$4,7 \pm 0,1$	2/25
Диапазон АТ		5,7–9,3		5,0–7,5		3,7–6,8	8,0
% особей с АГ в легких			48,0		15,6		

Примечание. Здесь и в табл. 2: А – группа полевков с высокой иммунореактивностью, Б – средней, В – низкой ( $n = 55; 35; 26$ ). Н.и. – не исследовали; \* – число особей с АГ в легких/число обследованных полевков.

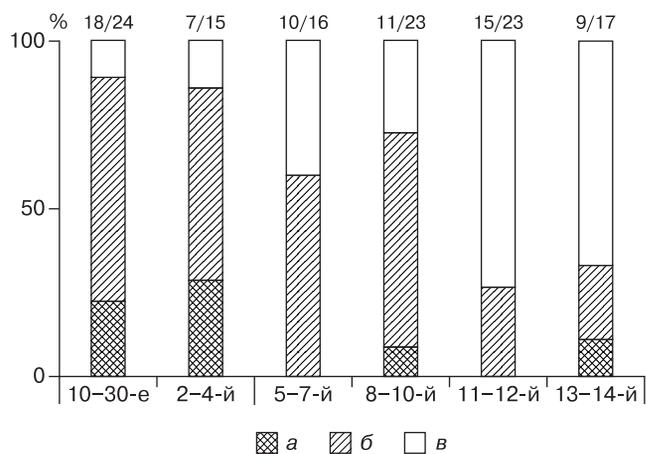


Рис. 2. Накопление АГ в органах рыжих полевков в разные периоды после экспериментального заражения PUUV (% от числа зверьков с АГ).

Доля особей с АГ в органах: а – только в легких; б – в легких и других органах; в – в других органах (-легкие); 18/24... – число особей с АГ/число обследованных полевков.

0,001), спинном мозге и слюнных железах ( $p \leq 0,01$ ), а также в почках. Для полевков группы А характерна высокая степень генерализации инфекции; АГ обнаружили в 5–9 органах у 18,2% из 33 носителей, выявленных в ходе эксперимента как в ранние, так и поздние сроки, а у большинства носителей из двух других групп ( $n = 24$ ) он присутствовал в 1–3 органах, редко – в 4. Кроме того, у полевков с высоким иммунным статусом наиболее ярко проявился пневмотропизм PUUV (см. табл. 1, 2). Присутствие АГ в легких зафиксировали у 73% из всех носителей этой группы, тогда как среди зверьков с меньшей иммунореактивностью у достоверно меньшего количества: у 36% из 14 и 20% из 10 соответственно ( $p < 0,01$ ). Следует отметить и периодичность в присутствии АГ в легких, что хорошо видно при анализе более полных данных, включающих результаты обследования зверьков в ранние сроки (10–30 дней) (рис. 2). В два первых периода и на 8–10-й месяц его выявили в легких более 80–70% носителей, тогда как в остальные сроки, особенно на 11–14-й месяц – существенно реже ( $p \leq 0,001$ ). В это время АГ чаще определяли в печени, буром жире, спинном и головном мозге, что связа-

но, по-видимому, с депонированием вируса в этих органах в латентную фазу инфекции.

Сравнение данных о накоплении АГ у самок и самцов не выявило между ними существенных различий как при учете только легких:  $32,9 \pm 5,2$  и  $36,9 \pm 6,9$  ( $n = 76\text{♀}$ ;  $65\text{♂}$ ), так и всех обследованных органов:  $55,7 \pm 5,9$  и  $63,8 \pm 6,3$  ( $n = 70\text{♀}$ ;  $54\text{♂}$ ) ( $p > 0,05$ ). Возрастные различия между полевками также отсутствовали.

## Обсуждение

По теории Е.С. Шварца с соавт., природные популяции грызунов характеризуются генетической и физиологической разнокачественностью [15]. Это подтверждается наблюдениями о существовании разных функциональных группировок в природных и виварных популяциях рыжих полевков [14]. Наши длительные наблюдения за полевками, экспериментально зараженными PUUV, выявили существенные различия в иммунореактивности и накоплении вирусного антигена в органах трех групп особей. Для полевков с высоким иммунным статусом (А) были характерны: раннее появление специфических антител, ускоренный и интенсивный тип иммуногенеза, широкая генерализация инфекции, ярко выраженные пневмотропизм и периодичность процесса. У полевков со средней и низкой иммунореактивностью отметили замедленный темп иммуногенеза и существенно меньшая его интенсивность, ограниченная диссеминация вируса и малая степень поражения всех органов, включая легкие. Сходные варианты развития хантавирусной инфекции описаны и у других представителей семейства Cricetidae – оленьих хомячков (*Peromyscus maniculatus*), зараженных вирусом Sin Nombre (SNV); вирус удавалось выделить только из зверьков с диссеминированным типом инфекции [16].

Известно, что у рыжих полевков и полевых мышей, зараженных PUUV и Hantaan (HTNV), соответственно, в течение 1-го месяца преобладают низкоавидные АГ [13, 17]; кроме того, в крови и органах рыжих полевков выявлены иммунные комплексы (ИК) [7]. Роль ИК в патогенезе хантавирусных инфекций у грызунов изучена мало, но по результатам исследований на других экспериментальных моделях хорошо известно их участие в реализации различных иммунологических механизмов [18]. По совокупности наших данных можно предположить, что у полевков с разным иммунным статусом ИК образуются в различных условиях: при избытке нейтрализующих АГ – у полевков с высокой иммунореактивностью, а при недостаточном их количестве в ранние сроки – у прочих особей.

По-видимому, в первом случае формируется персистирующая фракция, уровень которой, как известно, во многом определяется свойствами АГ, взаимодействующих с вирусными частицами. В случае низкоавидных АГ диссоциация ИК более выражена, что обеспечивает продолжительную персистенцию PUUV и антигенную стимуляцию иммунокомпетентных клеток и объясняет, отчасти, высокий уровень иммунного ответа и зараженности полевков группы А. Кроме того, ИК, выполняя роль медиатора, могут активировать эндотелий сосудов, повышая их проницаемость [19, 20]. У полевков двух других групп при увеличении концентрации АГ, число ИК с избыточным содержанием вируса уменьшается и, возможно, они полностью исчезают. Это, вероятно, приводит к освобождению части зверьков от вируса, о чем свидетельствует более низкое число носителей АГ начиная со 2-го месяца. По-видимому, ключевая роль в элиминации вируса принадлежит эффекторным Т-клеткам. Так, при изучении инфекции, вызванной HTNV в присутствии

Таблица 2

Частота и интенсивность накопления АГ в органах и экскретах рыжих полевков, имеющих разную иммунореактивность, со 2-го по 14-й месяц после заражения PUUV (штамм Казань 6 С. г.)

Орган	% особей с АГ ( $M \pm m$ )/макс. титр АГ			p
	А (n = 46)	Б (n = 26)	В (n = 23)	
Легкие	48,0 ± 7,1/256	15,6 ± 6,4/8	8,0 ± 5,4/Н. р.*	А от Б и В < 0,001
Бурый жир	28,9 ± 6,8/256	12,5 ± 6,8/2	13,0 ± 7,0/Н. р.	–
Слюнные железы	22,2 ± 6,2/256	8,3 ± 5,6/Н. р.	4,3 ± 4,2/Н. р.	А от В < 0,05
Головной мозг	31,8 ± 7,0/16	4,5 ± 4,4/32	4,5 ± 4,4/Н. р.	А от Б и В < 0,001
Спинной мозг	25,0 ± 6,5/32	4,5 ± 4,4/Н. р.	4,5 ± 4,4/Н. р.	А от Б и В < 0,01
Печень	24,4 ± 6,4/16	18,2 ± 8,2/8	18,2 ± 8,2/2	–
Селезенка	8,9 ± 4,2/8	14,8 ± 6,8/2	9,5 ± 6,4/2	–
Лимфоузлы + тимус	4,7 ± 3,2/4	4,8 ± 4,6/Н. р.	10,0 ± 6,7/Н. р.	–
Почки	13,3 ± 5,1/4	0	0	А от Б и В
Мочевой пузырь, моча	2,1 ± 2,1/Н. р.	4,5 ± 4,4/Н. р.	4,5 ± 4,4/Н. р.	–
Прямая кишка, кал	2,3 ± 2,3/Н. р.	4,3 ± 4,2/Н. р.	0	–
Всего особей с АГ в органах, % (абс.)	72,0 ± 6,6 (33)	53,8 ± 9,8 (14)	43,5 ± 10,3 (10)	А от В < 0,05

Примечание. \* – исходный титр АГ (Н. р. – не разведенный).

нейтрализующих АТ, было показано, что персистенция возникает в результате неспособности нефункциональных CD8+Т клеток элиминировать вирус [21]. Установлено также, что при заражении клеток фибробластов рыжих полевков *in vitro* PUUV не индуцирует образование интерферона β [22]. В настоящее время рассматривается роль приобретенного и врожденного иммунитета в персистенции хантавирусов у природных хозяев [12].

Выявленные индивидуальные различия в восприимчивости к PUUV не связаны с принадлежностью полевков к определенным половозрастным группам. По-видимому, у рыжих полевков, как и у людей, существование нескольких типов иммунного ответа к PUUV (высокого, среднего, низкого) генетически детерминировано. В природе большая зараженность половозрелых самцов особенно связана с их подвижностью и характером поведения в репродуктивный период, что определяет ведущую роль самцов в сохранении и распространении инфекции в популяциях рыжей полевки [5].

Таким образом, выраженные различия в иммунореактивности и накоплении АГ в органах рыжих полевков свидетельствуют о вариабельности популяции по степени восприимчивости к PUUV и предполагают существование разных механизмов персистенции и адаптивной стратегии вируса во взаимоотношениях с хозяином. Вероятно, каждая из выявленных групп, играет особую роль, от их соотношения в популяции может зависеть цикличность течения эпизоотического процесса. Гетерогенность популяции по морфофизиологическим и иммунологическим параметрам определяет разнообразие условий существования вируса и создает предпосылки для его внутривидовой изменчивости по признакам патогенности и иммуногенности. Для дальнейшего исследования взаимоотношений между сочленами экосистемы хантавирус–хозяин в естественных условиях необходимо одновременное изучение состава и состояния их популяций на всех фазах эпизоотического цикла.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Khaiboullina S.F., Morzunov S.P., Jeor C.St. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. *Curr. Mol. Med.* 2005; 5: 773–90.
2. Clement J., Maes P., Van Ranst M. Hantaviruses in the Old and New World. *Emerging Viruses in Human Populations: Perspectives in Medical Virology.* 2007; 163–180.
3. 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.
4. Plyusnin A., Morzunov S.P. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001; 256: 47–75.
5. Bernshtein A.D., Apekina N.S., Mikhailova T.V., Myasnikov Yu.A., Khlyap L.A., Korotkov Yu.S. et al. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch. Virol.* 1999; 144 (12): 2415–28.
6. Hardestam J., Karisson M., Falk K.I., Olsson G., Klingström J., Lundkvist Å. Puumala hantavirus excretion kinetics in bank voles (*Myodes glareolus*). *Emerging Infect. Dis.* 2008; 14(8): 1209–15.
7. Богданова С.Б., Гавриловская И.Н., Бойко В.А., Прохорова И.А., Линева М.Б., Апкина Н.С. и др. Персистирующая инфекция, вызванная вирусом геморрагической лихорадки с почечным синдромом у рыжих полевков (*Clethrionomys glareolus*) – природных хозяев вируса. *Микробиологический журнал (Киев).* 1987; 49 (3): 99–106.
8. Gavrilovskaya I.N., Apekina N.S., Bernshtein A.D., Demina V.T., Okulova N.M., Myasnikov Yu.A. et al. Pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome virus infection and mode of horizontal transmission of hantavirus in bank voles. *Arch. Virol.* 1990; 1: 57–62.
9. Meyer B.J., Schmaljohn C.S. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol.* 2000; 8: 61–7.
10. Klein S.L., Calisher C.H. Emergence and persistence of hantaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007; 317: 217–52.
11. Mackow E.R., Gavrilovskaya I.N. Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb. Haemost. Rev.* 2009; 102 (6): 1030–41.
12. Easterbrook J.D., Klein S.L. Immunological mechanisms mediating hantavirus persistence in rodent reservoirs. *Plos Pathogens. Review.* 2008; 4 (11): 1–8.
13. Gavrilovskaya I.N., Apekina N.S., Okulova N.M., Demina V.T., Bernshtein A.D., Myasnikov Yu.A. et al. IG avidity assay for estimation of the time after onset of hantavirus infection in colonized and wild bank voles. *Arch. Virol.* 1993; 132: 359–67.

14. Демина В.Т., Бернштейн А.Д., Коротков Ю.С. Сравнительный анализ репродуктивного процесса у рыжей полевки в природе и в лабораторной колонии. *Бюлл. Моск. об-ва испытателей природы. Отд. биол.* 1997; 102 (6): 11–9.
15. Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. М.: Наука. 1980.
16. Botten J., Mirowsky K., Kusewitt D., Ye Ch., Gottlieb K., Prescott J. et al. Persistent Sin Nombre virus infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) model: sites of replication and strand-specific expression. *J. Virol.* 2003; 77 (2): 1540–50.
17. Максема И.Г., Кушнарева Т.В., Компанец Г.Г., Слонова Р.А. Динамика антител разной avidности у мышевидных грызунов в эпизоотическом и эпидемическом процессах при хантавирусной инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2008; 3: 21–3.
18. Первиков Ю.В., Эльберт Л.Б. *Иммунные комплексы при вирусных инфекциях.* М.: Медицина; 1984.
19. Cosgriff T.M. Mechanisms of hantavirus infection: pathophysiology of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13: 97–107.
20. Gavrilovskaya I.N., Gorbunova E.E., Mackow N.A., Mackow E.R. Hantavirus direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiopoietin 1 and sphingosine phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. *J. Virol.* 2008; 82 (12): 5797–806.
21. Araki K., Yoshimatsu K., Lee B.-H., Kariwa H., Takashima I., Arikawa I. A new model of Hantaan virus persistence in mice: the balance between HTNV infection and CD8<sup>+</sup> T-cell responses. *Virology.* 2004; 322: 318–27.
22. Stoltz M., Sundstrom K.B., Hidmark A., Tolf C., Vene S., Ahlm C. et al. A model system for in vitro studies of bank vole borne viruses. *Plos one.* 2011; 6 (12): 1–8.

#### REFERENCES

1. Khaiboullina S.F., Morzunov S.P., Jeor C.St. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. *Curr. Mol. Med.* 2005; 5: 773–90.
2. Clement J., Maes P., Van Ranst M. Hantaviruses in the Old and New World. *Emerging Viruses in Human Populations: Perspectives in Medical Virology.* 2007; 163–80.
3. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Tkachenko P.E. Hantaviruses: ecology, molecular biology, morphology, pathogenesis and diagnostics of the hantaviruses infections. *Molekulyarnaya medicina.* 2009; 5: 36–41.
4. Plyusnin A., Morzunov S.P. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001; 256: 47–75.
5. Bernshtein A.D., Apekina N.S., Mikhailova T.V., Myasnikov Yu.A., Khlyap L.A., Korotkov Yu.S. et al. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch. Virol.* 1999; 144 (12): 2415–28.
6. Hardestam J., Karisson M., Falk K.I., Olsson G., Klingström J., Lundkvist Å. Puumala hantavirus excretion kinetics in bank voles (*Myodes glareolus*). *Emer. Infect. Dis.* 2008; 14(8): 1209–15.
7. Bogdanova S.B., Gavrilovskaya I.N., Boiko V.A., Prokhorova I.A., Lineva M.B., Apekina N.S. et al. Persisting infection induced by Hemorrhagic Fever with renal syndrome in red mice (*Clethrionomys glareolus*), natural hosts of the virus. *Mikrobiologicheskij zhurnal. Kiev.* 1987; 49 (3): 99–106 (in Russian).
8. Gavrilovskaya I.N., Apekina N.S., Bernshtein A.D., Demina V.T., Okulova N.M., Myasnikov Yu.A. et al. Pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome virus infection and mode of horizontal transmission of hantavirus in bank voles. *Arch. Virol.* 1990; 1: 57–62.
9. Meyer B.J., Schmaljohn C.S. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol.* 2000; 8: 61–7.
10. Klein S.L., Calisher C.H. Emergence and persistence of hantaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007; 317: 217–52.
11. Mackow E.R., Gavrilovskaya I.N. Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb. Haemost. Rev.* 2009; 102 (6): 1030–41.
12. Easterbrook J.D., Klein S.L. Immunological mechanisms mediating hantavirus persistence in rodent reservoirs. *Plos Pathogen. Rev.* 2008; 4 (11): 1–8.
13. Gavrilovskaya I.N., Apekina N.S., Okulova N.M., Demina V.T., Bernshtein A.D., Myasnikov Yu.A. et al. IG avidity assay for estimation of the time after onset of hantavirus infection in colonized and wild bank voles. *Arch. Virol.* 1993; 132: 359–67.
14. Demina V.T., Bernshtein A.D., Korotkov Yu.S. Comparative analysis of reproductive process in bank vole in nature and in the laboratory colony. *Byulleten' Moskovskogo obshchestva ispytateley prirody.* 1997; 102 (6): 11–9 (in Russian).
15. Schwarz S.S. *Ecological regularities of evolution. [Ekologicheskie zakonomernosti evolyutsii].* М.: Science. 1980 (in Russian).
16. Botten J., Mirowsky K., Kusewitt D., Ye Ch., Gottlieb K., Prescott J. et al. Persistent Sin Nombre virus infection in the deer mouse (*Pero-*

- myscusc maniculatus) model: sites of replication and strand-specific expression. *J. Virol.* 2003; 77 (2): 1540–50.
17. Maksema I.G., Kushnareva T.V., Kompanets G.G., Slonova R.A. Time course of changes in antibodies of various avidity in murine rodents in the epizootic and epidemic processes in hantavirus infection. *Vopr. Virusol.* 2008; 53 (3): 21–3 (in Russian).
  18. Pervikov Yu.V., Elbert L.B. *Immune complexes in viral infections. [Immunnye komplekсы pri virusnykh infektsiyakh]*. Moscow: Meditsina; 1984 (in Russian).
  19. Cosgriff T.M. Mechanisms of hantavirus infection: pathophysiology of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13: 97–107.
  20. Gavrillovskaya I.N., Gorbunova E.E., Mackow N.A., Mackow E.R.

- Hantavirus direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiotensin II and sphingosine phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. *J. Virol.* 2008; 82 (12): 5797–806.
21. Araki K., Yoshimatsu K., Lee B.-H., Kariwa H., Takashima I., Arikawa I. A new model of Hantaan virus persistence in mice: the balance between HTNV infection and CD8<sup>+</sup> T-cell responses. *Virology.* 2004; 322: 318–27.
  22. Stoltz M., Sundstrom K.B., Hidmark A., Tolf C., Vene S., Ahlm C. et al. A model system for in vitro studies of bank vole borne viruses. *Plos One.* 2011; 6 (12): 1–8.

Поступила 05.02.13  
Received 05.02.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014  
УДК 616.98:578.833.3:578.76:619

Глотов А.Г.<sup>1</sup>, Глотова Т.И.<sup>1</sup>, Зайцев Ю.Н.<sup>1</sup>, Пьянков О.В.<sup>2</sup>, Сергеев А.Н.<sup>2</sup>, Гулюкин М.И.<sup>3</sup>

## Патогенность нецитопатогенных изолятов вируса вирусной диареи-болезни слизистых оболочек для серонегативных телят

<sup>1</sup>ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии, 630501, пос. Краснообск, Новосибирская область; <sup>2</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область; <sup>3</sup>ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко Россельхозакадемии, 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1.

Представлены результаты экспериментального заражения серонегативных телят тремя нецитопатогенными изолятами вируса вирусной диареи – болезни слизистых оболочек, выделенными от крупного рогатого скота с различными клиническими проявлениями болезни, относящимися к генотипу 1 (субгенотипы 1a, 1b и 1d). Все тестированные изоляты обладали вирулентностью для телят 4–6-месячного возраста. Принадлежность к биотипу не влияла на способность вируса инфицировать органы лимфоидной системы и индуцировать «транзитную» лейкопению (до 2880–3800 кл/мм<sup>3</sup>) в течение 8–10 дней, наступавшую у животных на 3–5-е сутки после заражения. Изолят кластера 1d был более вирулентным и вызывал слабый респираторный синдром и кратковременную диарею. Вирулентность имела «штаммовую» зависимость.

Ключевые слова: вирус диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота; биотипы; субгенотипы; полимеразная цепная реакция; экспериментальное заражение; лейкопения.

### Pathogenicity of Noncytopathic Isolates of Bovine Viral Diarrhea Virus in Experimentally Infected Seronegative Calves

Glotov A. G.<sup>1</sup>, Glotova T. I.<sup>1</sup>, Zaitsev Yu. N.<sup>1</sup>, Pyankov O. V.<sup>2</sup>, Sergeev A. N.<sup>2</sup>, Gulyukin M. I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Siberian Branch, Russian Academy of Agricultural Sciences, 630501, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russia; <sup>2</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia; <sup>3</sup> Ya.R. Kovalenko Institute of Experimental Veterinary Science, Russian Academy of Agricultural Sciences, 109428, Moscow, Russia

The results of experimental infection of seronegative calves with three non-cytopathogenic (NCP) isolates of BVDV isolated from cattle with different clinical manifestations of the disease belonging to genotype 1 (subgenotype 1a, 1b and 1d) are presented. All tested isolates showed the virulence for seronegative calves 4 to 6 months of age. Belonging to biotype did not correlate with the ability of the virus to infect the lymphoid tissues and to induce leukopenia. All isolates of the virus led to “transiting” leukopenia (up to 2880–3800 kl/mm<sup>3</sup>) for 8–10 days after infection. Isolate cluster 1d was more virulent and caused the development of a mild respiratory syndrome and short-term diarrhea. The virulence was “strain-dependent”.

Key words: BVD virus; biotypes; subgenotypes; polymerase chain reaction; experimental infection; leucopenia.

Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек (ВД-БС) крупного рогатого скота (КРС), широко распространена во всем мире и наносит значительный экономический ущерб молочному и мясному скотоводству. Возбудитель болезни – вирус семейства *Flaviviridae* рода *Pestivirus*. Идентифицированы два его биотипа – цитопатогенный (ЦП) и нецитопатогенный (НЦП), а также два генотипа – 1 и 2 [1]. Первый генотип вируса распространен повсеместно и насчитывает до 11 субгенотипов [2], второй, представленный двумя субгенотипами, циркулирует, в основном, в США и Канаде. Оба

генотипа могут иметь как ЦП-, так и НЦП-биотип. Болезнь чаще протекает субклинически [1, 3–4].

В природе преобладает НЦП-биотип, который имеет наибольшее эпизоотологическое значение и является наиболее вирулентным, поскольку вызывает трансплацентарную инфекцию, приводящую к репродуктивным нарушениям у коров и персистой инфекции (ПИ) плода, а также иммуносупрессию при острых постнатальных формах инфекции. Механизм иммуносупрессивного действия вируса включает лейкопению, снижение пролиферации лимфоцитов, истоще-

Для корреспонденции: Глотов Александр Гаврилович, glotov\_vet@mail.ru