

8. Feng Q., Langereis M.A., Lork M., Nguyen M., Hato S.V., Lanke K. et al. Enterovirus 2Apro targets MDA5 and MAVS in infected cells. *J. Virol.* 2014; 88(6): 3369–78.
9. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000; 63(7): 1035–42.
11. Gibellini L., Pinti M., Nasi M., Montagna J.P., De Biasi S., Roat E. et al. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011; 2011: 591356.
12. U-Mann–Whitney. Available at: <http://medstatistic.ru/theory/mann.html> (in Russian)
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65(1–2): 55–63.
14. West I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet.Med.* 2000; 17(3): 171–80.
15. Piconi L., Quagliario L., Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41(9): 1144–9.
16. Han S.N., Meydani S.N. Antioxidants, cytokines and influenza infection in aged mice and elderly humans. *J. Infect. Dis.* 2000; 182(Suppl. 1): S74–80.
17. Nathan C., Cunningham-Bussell A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(5): 349–61.
18. Ho H.Y., Cheng M.L., Weng S.F., Leu Y.L., Chiu D.T. Antiviral effect of epigallocatechin gallate on enterovirus 71. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(14): 6140–7.
19. Robin V., Irurzun A., Amoros M., Boustie J., Carrasco L. Antipoliiovirus flavonoids from *Psidium dentate*. *Antivir. Chem. Chemother.* 2001; 12(5): 283–91.
20. De Palma A.M., Vlieghe I., De Clercq E., Neyts J. Selective inhibitors of picornavirus replication. *Med. Res. Rev.* 2008; 28(6): 823–84. Available at: [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)

Поступила 05.05.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016  
УДК 578.833.29.083.2

*Иунихина О. В., Компанец Г. Г.*

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОХРАНЕНИЯ ХАНТАВИРУСА В КОМПЛЕКСАХ С СУБСТРАТАМИ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» СО РАМН, 690087, г. Владивосток

Длительность сохранения вирусов во внешней среде, особенно вирусов инфекций с непрямой передачей, является актуальной проблемой в эпидемиологии. В данной работе представлены результаты экспериментального изучения возможности адсорбции и сохранения хантавируса на различных субстратах внешней среды (природные органические и неорганические сорбенты). Установлена эффективность белоксодержащего раствора для элюции инфекционного хантавируса (5–10% бычий сывороточный альбумин) и фосфатно-солевого буфера с pH 7,2 при обнаружении специфической РНК. Показана возможность сохранения хантавируса в комплексе с субстратами внешней среды до 14 дней при 4°C.

Ключевые слова: хантавирус; адсорбция; сохранение во внешней среде; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 31–33. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-31-33

*Iunikhina O.V., Kompanets G.G.*

## EXPERIMENTAL RESEARCH OF THE HANTAVIRUS SURVIVAL IN COMPLEXES WITH ENVIRONMENTAL SUBSTRATES

G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

Survival of viruses in the environment is a very important problem in epidemiology, especially for infections with indirect transmission. This work describes the results of the experimental study of adsorption and survival of the hantavirus on different environmental substrates (natural organic and inorganic sorbents). Bovine serum albumin (BSA) solution (5–10%) was effective in the hantavirus elution and phosphate-buffer saline (PBS) pH 7.2 was optimal for elution of specific RNA. Potential survival of the infectious hantavirus on environmental substrates was observed within up to 14 days at +4°C.

Key words: hantavirus; adsorption; survival in environment; reverse transcription polymerase chain reaction.

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 31–33. (In Russ.). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-31-33

For correspondence: Olga Iunikhina, MD, PhD; e-mail: [olga\\_iun@inbox.ru](mailto:olga_iun@inbox.ru)

Received 04.08.14

### Введение

Хантавирусы, представители рода *Hantavirus* семейства Bunyviridae, как и их основные природные хозяева мелкие грызуны, широко распространены по всему миру и вызывают на территории Евразийского континента геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС), а в Северной и Южной Америке – хантавирусный кардиолегочный синдром (ХКЛС). Инфицирование грызунов – природных носителей

вируса, а также людей происходит преимущественно при вдыхании выделений грызунов, контаминированных хантавирусом [1]. Таким образом, для реализации аэрогенного механизма передачи хантавирусы должны обладать определенной стабильностью вне организма хозяина. Длительность сохранения вирусов в окружающей среде является актуальной проблемой для эпидемиологии тех заболеваний, при которых передача возбудителя происходит при прямом контакте с ис-

Для корреспонденции: Иунихина Ольга Викторовна, канд. мед. наук, научный сотрудник лаб. хантавирусных инфекций; e-mail: [olga\\_iun@inbox.ru](mailto:olga_iun@inbox.ru)

точником инфекции. До настоящего времени в литературе появились лишь единичные экспериментальные данные о возможности сохранения инфекционного хантавируса во внешней среде [2, 3].

Ранее нами было показано, что хантавирус способен адсорбироваться на цеолите и бентоните [4]. В то же время не изучалась возможность адсорбции и длительность выживания хантавируса на субстратах, входящих в состав почвы, куда он может попасть с экскретами мышевидных грызунов. Выяснение этих вопросов явилось целью нашей работы.

### Материал и методы

В исследованиях использовали супернатант клеток Vero E6, инфицированных штаммом Аа 60343 геновариант Far East вируса Хантаан. Титр инфекционного вируса определяли в образцах вирусосодержащей жидкости до и после контакта вируса с сорбентом с помощью метода выявления инфекционных фокусов [5] и выражали в Ig ФОЕ/мл.

После определения исходного титра (5,0–5,6 Ig ФОЕ/мл) вирусосодержащую жидкость распределяли на аликвоты и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до соединения с адсорбентами.

В качестве сорбентов использовали частицы цеолита Чугуевского месторождения размером 0,05 мм, бентонита, образцы лесной, садово-огородной, луговой почв из разных районов Приморского края. Адсорбцию проводили согласно описанной ранее методике [4].

Для изучения сохранения жизнеспособности хантавируса образцы вирусосодержащей жидкости, хранившиеся при комнатной температуре ( $22^{\circ}\text{C}$ ), отбирали каждый час в течение 8 ч, а при хранении в условиях холодильника ( $4^{\circ}\text{C}$ ) ежедневно в течение 3 нед.

Для оценки эффективности элюции и сохранения вируса в комплексе с сорбентом через определенные промежутки времени супернатант удаляли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин, а осадок однократно промывали стерильной дистиллированной водой и повторно центрифугировали при указанных выше условиях. К полученному осадку сорбента добавляли элюирующий раствор, тщательно встряхивали, оставляли на контакт в течение 30 мин и отбирали пробы элюата. В качестве элюирующих растворов использовали стерильные фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,2, боратно-буферный раствор (ББР) pH 9,0 и 5–10% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), приготовленный на ФСБ pH 7,2 и ББР pH 9,0.

Для выделения вирусной РНК использовали набор реагентов производства «АмплиСенс» (РИБО-сорб и РИБО-золь-С, АмплиСенс Hantavirus-EPh, Реверта-L, ЭФ) для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле согласно инструкции производителя.

### Результаты и обсуждение

Экспериментально показано, что при комнатной температуре ( $22^{\circ}\text{C}$ ) защищенный от прямого воздействия солнечного света в жидкой среде хантавирус сохраняет инфекционность только в течение ограниченного времени, о чем свидетельствовало резкое снижение титра вируса в течение суток до уровня, не определяемого с помощью использованного метода. При хранении вирусосодержащей жидкости при  $4^{\circ}\text{C}$  выявлено постепенное снижение титра вируса до 1,8 ФОЕ/мл к 21-му дню опыта.

Все исследуемые образцы субстратов полностью адсорбировали хантавирус из вирусосодержащей жидкости

### Элюция хантавируса из комплексов вирус + сорбент

Субстрат	Эффективность элюции (исходный титр вируса 5,0–5,6 Ig/мл), Ig			
	ФСБ pH 7,2	ББР pH 9,0	5–10% БСА на ББР pH 9,0	5–10% БСА на ФСБ pH 7,2
Цеолит 0,05 мм	РНК	н. о.	2,8	3,0–3,5
Лесная почва	РНК	н. о.	2,5–4,0	2,5–3,2
Луговая почва	РНК	н. о.	н. и.	2,5 Ig
Садово-огородная почва	РНК	н. о.	н. и.	РНК
Солома	РНК	н. о.	н. и.	РНК

Примечание. н. и. – не исследовали; РНК – обнаружена только специфическая РНК в ОТ-ПЦР; н. о. – не обнаружен хантавирус при титровании на культуре клеток.

в течение 1–3 сут при  $4^{\circ}\text{C}$ , что подтверждалось отсутствием вируса в надосадочной жидкости.

Элюция хантавируса из комплекса с сорбентом происходила только при использовании растворов, содержащих белок: 5–10% БСА на ФСБ pH 7,2 и ББР pH 9,0 (см. таблицу). Эффективность элюции также зависела от типа сорбента. При адсорбции на цеолит восстановление составило в среднем 3,5 Ig ФОЕ/мл при использовании в качестве основы буфера с нейтральной pH (щелочной буфер восстанавливал до 2,8 Ig ФОЕ/мл). При элюции хантавируса с образцом лесной почвы наиболее эффективным оказался щелочной буфер (до 4,0 Ig ФОЕ/мл) по сравнению с ФСБ pH 7,2 (до 3,2 Ig ФОЕ/мл). Использование разной концентрации белка (5 или 10%) не показало существенных различий в показателях титра восстановленного вируса ( $\pm 0,2$  Ig ФОЕ/мл).

Образцы элюирующих растворов независимо от результатов титрования на культуре клеток Vero E6 были исследованы с помощью ОТ-ПЦР на наличие специфической РНК. В результате получены данные о присутствии РНК хантавируса в элюатах не только при десорбции белоксодержащим раствором, но и при использовании раствора ФСБ (pH 7,2). Так, в элюатах с садово-огородной почвы титр хантавируса на культуре клеток не определялся, однако в пробах была обнаружена специфическая РНК. Отмечено наличие специфической РНК после хранения элюатов (ФСБ pH 7,2 и 5% БСА) с цеолита (фракция 0,05 мм) и лесной почвы после хранения при  $4^{\circ}\text{C}$  до 14-го дня.

Несмотря на то что после хранения комплексов сорбент – хантавирус в течение 7–14 дней при  $4^{\circ}\text{C}$  титр вируса не определялся, после 2 пассажей элюата на культуре клеток Vero E6 антиген хантавируса обнаружен в 80% клеток с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител.

Вирусы, являясь внутриклеточными паразитами, не способны размножаться вне организма чувствительного хозяина, однако возможность сохранения инфекционности в разных условиях внешней среды играет важную роль в поддержании инфекционного процесса. Наиболее хорошо изучена способность некоторых вирусов сохраняться в водной среде, что может приводить к возникновению крупных вспышек заболевания среди людей [6]. Также доказано выживание некоторых вирусов в окружающей среде. Например, энтеровирусы и реовирусы не просто эффективно адсорбируются на частицы неорганических веществ, но такая связь способствует их выживанию и персистенции в различных экосистемах [7].

Таким образом, для реализации непрямого механизма передачи хантавируса должны обладать определенной

стабильностью вне организма хозяина. Аэрогенный механизм заражения при хантавирусной инфекции признан на основании многочисленных эпидемиологических данных, в том числе результатах анализа лабораторных вспышек ГЛПС [1], а также данных о периодичности выделения хантавируса грызунами во внешнюю среду с мочой, калом и слюной на фоне длительной персистентной инфекции [8–10].

Полученные нами данные свидетельствуют не только о возможности обратимой адсорбции хантавируса с различных природных субстратов, но и о сохранении в них инфекционного вируса в течение 14 дней при благоприятных условиях (пониженная температура, отсутствие солнечного света, влажность), которые наблюдаются в норах и других природных убежищах мышевидных грызунов. Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее другими авторами, но выявленные различия в сроках сохранения инфекционного вируса (до 18 [3] и 96 [2] дней при 4°C) по всей видимости отражают различную чувствительность применяемых методик анализа, что подтверждается обнаружением специфической РНК и выделением вируса после нескольких пассажей на культуре клеток.

Эффективность использования белоксодержащего раствора для десорбции вируса по всей вероятности связана с феноменом конкуренции за специфические участки адсорбции на поверхности между молекулами белка и вирусными частицами, а также со снижением силы гидрофобных связей между вирусом и поверхностью сорбента, например почвы [11, 12]. Можно предположить, что данный механизм реализуется и при попадании частиц пыли с адсорбированным вирусом в дыхательные пути, когда наряду с процессом фагоцитоза контакт с биологическими жидкостями, богатыми белком, способствует проникновению хантавируса в чувствительные клетки хозяина.

### Заключение

Таким образом, несмотря на то что аэрогенный путь заражения хантавирусом является основным путем инфицирования, сроки выживания патогена вне организма природного хозяина и соответственно его инфекционный потенциал существенно ограничены даже при благоприятных условиях, что подтверждается преимущественной регистрацией спорадических случаев заболевания ГЛПС и ХКЛС. В то же время такие благоприятные условия могут сохраняться в норах грызунов, что наряду с прямым путем заражения обеспечивает поддержание инфекционного процесса даже при низких показателях численности и инфицированности популяций природных хозяев хантавируса.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–3, 5–12 с.м. REFERENCES)

4. Иунихина О.В., Компанец Г.Г., Слонова Р.А. Способность хантавируса адсорбироваться на почвообразующих минеральных частицах. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2008; 13: 134–8.

### REFERENCES

1. Schmaljohn C., Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3 (2): 95–104.
2. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (8): 2547–51.
3. Kallio E.R., Klingstrom J., Gustafsson E., Manni T., Vaheri A., Henttonen H. et al. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J. Gen. Virol.* 2006; 87 (8): 2127–34.
4. Iunikhina O.V., Kompanets G.G., Slonova R.A. Ability of hantavirus adsorbs on soil forms mineral particle. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2008; 13: 134–8. (in Russian)
5. Lee P.W., Gibbs C.J., Gajdusek D.C., Yanagihara R.T. Serotypic classification of hantavirus by indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22 (6): 940–4.
6. Sinclair R.G., Jones E.L., Gerba C.P. Viruses in recreational waterborne disease outbreaks: a review. *J. Appl. Microbiol.* 2009; 107 (6): 1769–80.
7. Sobsey M.D., Meschke J.S. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. World Health Organization. 2003. Available at: [http://www.unc.edu/courses/2008spring/envr/421/001/WHO\\_VirusSurvivalReport\\_21Aug2003.pdf](http://www.unc.edu/courses/2008spring/envr/421/001/WHO_VirusSurvivalReport_21Aug2003.pdf). (Accessed 29 May 2014).
8. Bernshtein A.D., Apekina N.S., Mikhailova T.V., Myasnikov Y.A., Khlyap L.A., Korotkov Y.S. et al. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch. Virol.* 1999; 144 (12): 2415–28.
9. Calisher C.H., Peters C.J., Douglass R.J., Kuenzi, A.J. Hantaviral infections of rodents: Possible scenarios. *Arch. Virol.* 2009; 154 (8): 1195–7.
10. Yanagihara R., Amyx H.L., Gajdusek D.C. Experimental infection with Puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *J. Virol.* 1985; 55 (1): 34–8.
11. Monpoeho S., Maul A., Mignotte-Cadiergues B., Schwartzbrod L., Billaudel S., Ferre V. Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67 (6): 2484–8.
12. Quignon F., Thomas F., Gantzer C., Huyard A., Schwartzbrod L. Virus adsorption in a complex system: an experimentally designed study. *Wat. Res.* 1998; 32 (4): 1222–30.

Поступила 04.08.14