

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-097(571.63)

И.Г. Максема, Г.Г. Компанец, Т.В. Кушнарева, Р.А. Слонова

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, гуморальный иммунитет, серотип/генотип хантавируса.

Представлены результаты изучения динамики антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. По результатам реакции торможения геагглютинации в отдельных случаях у больных со среднетяжелым течением инфекции выявлен более выраженный иммунный ответ, особенно в начальный период болезни, в отличие от тяжелых форм. Показана значимость использования реакции торможения геагглютинации для получения информации об участии определенных серотипов/генотипов хантавируса в эпидемическом процессе. Изучена динамика специфических антител у пациентов с различными формами заболевания в реакции нейтрализации. Величина титра нейтрализующих антител существенно не зависела от тяжести течения, однако прослеживалась тенденция к более высокому ее значению у больных с легкими формами заболевания в период разгара болезни и фазу поздней реконвалесценции.

В природных очагах геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) на территории Российской Федерации доказана циркуляция пяти хантавирусов: *Puumala*, *Dobrava/Belgrade*, *Hantaan*, *Amur*, *Seoul*, которые вызывают заболевания разной степени тяжести. На основании сравнения структуры генома вирусной РНК, изолированной из крови больных людей и органов грызунов, выявлены конкретные виды грызунов, источников возбудителей ГЛПС [1, 5]. Установлено, что на очаговых территориях в отдельных географических регионах грызуны — носители определенного генотипа — могут занимать доминирующее положение и определять особенности эпидемиологического и клинического проявления инфекции. В дальневосточном регионе нашей страны в сельских очагах в качестве возбудителя ГЛПС доминируют вирусы *Hantaan* (геновариант *Far East*), и *Amur*, грызуны-носители которых — *Apodemus agrarius* и *Apodemus peninsulae* соответственно [4]. В очаге городского типа в Приморском крае этиологию заболевания в основном определяет вирус *Seoul*. В то же время часть случаев в городском очаге (около 34,4%) среди лиц, выезжавших за 2–3 недели до заболевания в природные очаги, была обусловлена вирусами *Hantaan* и *Amur* [1]. Таким образом, мозаичность распространения хантавирусов в природных очагах ГЛПС диктует необходимость их типирования для получения адекватной информации об участии определенного возбудителя в эпидемическом процессе в Приморском крае.

Известно, что значительные серологические перекрестные реакции между близкородственными

хантавирусами затрудняют постановку этиологического диагноза ГЛПС с помощью таких широко используемых методов диагностики, как непрямой метод флюоресцирующих антител и иммуноферментный анализ, и что реакция нейтрализации малоэффективна на ранней стадии заболевания, поскольку нейтрализующие антитела к гомологичному вирусу, как правило, образуются в поздние сроки болезни. Ранее при исследовании сывороток крови от больных была показана возможность использования реакции торможения геагглютинации не только для серодиагностики, но и для установления антигенных взаимосвязей между штаммами хантавирусов и определения типовой принадлежности штамма, вызвавшего заболевание [1, 3, 14]. Последнее обусловлено тем, что оболочечные гликопротеины G1 и G2 хантавирусов обладают геагглютинирующей активностью и индуцируют рН-зависимое клеточное взаимодействие, играющее важную роль в прикреплении вируса к поверхности чувствительных клеток. С. Schmaljohn также полагает, что иммуногенная роль принадлежит обоим гликопротеинам [12].

Несмотря на очевидное сходство ведущего симптомокомплекса болезни, особенности клинических проявлений ГЛПС, тяжесть и прогноз течения инфекции зависят не только от антигенной вариабельности возбудителя, но и связаны с другими факторами, в том числе со способностью иммунной системы больного модулировать специфический ответ. Согласно рабочей гипотезе ведущим механизмом патогенеза ГЛПС является сложный комплекс нарушений преимущественно клеточного звена иммунитета [2]. Однако С. Schmaljohn et al. (1986) и J. Arikawa et al. (1990) показали в экспериментальных исследованиях значение антител к нуклеокапсидному белку N в защите от хантавирусной инфекции животных [6, 13]. Эффективность защиты рекомбинантного белка N при заражении лабораторных животных хантавирусами, на фоне отсутствия специфических антител к белкам оболочки вириона G1 и G2, была показана также А. Lundkvist et al. [11]. Эти данные подтверждают важную роль гуморального звена иммунитета в защите от хантавирусной инфекции.

Целью нашей работы была оценка динамики формирования и сохранения специфических антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител у больных ГЛПС на различных территориях Приморского края, а также определение значения гуморального

Таблица 1

Динамика накопления специфических антигемагглютининов у больных ГЛПС в зависимости от тяжести и периода болезни

Течение заболевания	СГТ антител в разные периоды болезни, log ₂				
	1–7-й день	8–14-й день	15–21-й день	21–30-й день	более 1 мес.
Тяжелое (n=36)	7,6±0,45	8,4±0,55	8,5±0,51	9,1±0,50	9,3±0,33
Среднетяжелое (n=69)	8,3±0,38	8,5±0,27	8,9±0,35	9,3±0,42	8,9±0,36
p*	0,26	0,99	0,52	0,84	0,55
Всего (n=105):	7,9	8,5	8,8	9,3	9,0

* Значимость различий между показателями у больных с тяжелым и среднетяжелым течением инфекции.

иммунного ответа макроорганизма в патогенезе инфекции, вызванной различными серотипами хантавируса.

Исследован 161 образец сыворотки крови, взятой от больных ГЛПС в динамике заболевания из разных районов Приморского края. Наличие антител к хантавирусам подтверждено непрямым методом флюоресцирующих антител.

Для определения вируснейтрализующих антител использовали метод FRNT (Focus Reduction Neutralization Test), предложенный P.W. Lee et al. [9]. В его основе лежит выявление фокусов инфицированных клеток, сформированных при размножении хантавируса на культуре клеток под полужидким покрытием. Разведение сыворотки, дающее не менее 80% снижения числа фокусов, по сравнению с отрицательной сывороткой, считали ее нейтрализующим титром.

В работе использовали гемагглютинирующие антигены штаммов хантавирусов, циркулирующих в Приморском крае: *Hantaan* – геновариант *Far East*, *Amur*, *Seoul* – геновариант *Vladivostok*. Все этапы реакции торможения гемагглютинации – разведение сыворотки, определение рабочей дозы гемагглютинирующих антигенов, – а также сроки инкубации и контроль проводили согласно описанной методике [3]. Титром антигемагглютининов считали наивысшее разведение сыворотки крови, которое вызвало полную или почти полную задержку агглютинации эритроцитов. Основанием для постановки этиологического диагноза ГЛПС являлась 4-кратная разница в титре антигемагглютининов к антигенам гомологичного и гетерологичного вирусов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Биостат». Для проверки достоверности результатов использовали критерий Стьюдента.

Антигемагглютинины в крови больных ГЛПС появлялись на 4–6-й день от начала заболевания (лихорадочный период), увеличивались в титре на 8–15-й день (поздняя олигурическая и ранняя полиурическая стадия), достигали максимума к 21-му дню (стадия выздоровления) и оставались на высоком уровне до 30-го дня, после чего наступало их незначительное снижение. Средняя геометрическая титров (СГТ) антител существенно не отличалась у больных с тяжелыми и

среднетяжелыми формами болезни. В то же время при среднетяжелых случаях ГЛПС мы наблюдали тенденцию к более выраженному иммунному ответу, особенно в начальный период болезни в отличие от тяжелых форм. Установлено, что в сыворотках крови пациентов, полученных в фазу поздней реконвалесценции через 5–11 мес. и 5 лет после перенесенного заболевания, уровень антигемагглютининов оставался высоким независимо от тяжести инфекции (табл. 1).

Анализируя клиническое значение антигемагглютининов, Z. Liu et al. (1992) показали сходную динамику формирования гемагглютинирующих антител в течение болезни при всех формах, отметив при этом значительные отличия у больных с ургентными состояниями: титры антител в их сыворотках падали с увеличением срока заболевания [10].

В результате серотипирования сывороток крови от 80 больных ГЛПС из сельских районов Приморского края и г. Владивостока в 32 случаях заболевания установлена этиологическая роль вируса *Far East*, в 34 случаях – вируса *Amur*, в 14 случаях – вируса *Seoul*. В сельских районах края случаи заболевания, обусловленные вирусом *Amur*, составили 59,3%, этиологическая роль вируса *Far East* установлена у 40,7% больных ГЛПС. Однако, на наш взгляд, оценка данного показателя будет более точной при использовании его в пределах выделенных очаговых регионов и эпидемических районов. Так, например, в 2002–2003 гг. по данным серотипирования заболеваемость ГЛПС была связана в большей степени с вирусом *Far East*, чем *Amur*, хотя среднегодовой показатель инфицированности *A. agrarius* был в 1,7 раза ниже, чем *A. peninsulae* ($p < 0,05$). При анализе данных эпиданамнеза оказалось, что заражение этой группы больных произошло в лугополевых биотопах центральных районов края, где доминировала по численности и инфицированности *A. agrarius*. Доля инфицированных грызунов этого вида в отловах составила 42,3%, в то время как доля инфицированных *A. peninsulae* – 5,8%. В 2004 г. в этиологической структуре заболеваемости ГЛПС (по результатам реакции торможения гемагглютинации) преобладали случаи, обусловленные вирусом *Amur*, что было связано с активацией эпизоотического процесса в популяции восточно-азиатской мыши (*A. peninsulae*). Доля инфицированных *A. agrarius* и *A. peninsulae* в лугополевых биотопах со-

ставила 61 и 5,6% соответственно. Напротив, в лесных биотопах (преобладающих в северных районах края) доля инфицированных *A. agrarius* равнялась 5,2%, а *A. peninsulae* — 79%. В 2005 г. серологическое подтверждение участия вируса *Amur* в заболеваемости ГЛПС по краю составило 61,3%, чему предшествовало преобладание *A. peninsulae* над *A. agrarius* по численности и инфицированности.

В сыворотках крови больных, заражение которых произошло в природных очагах, где доминировала среди отловленных животных *A. peninsulae*, СГТ антител к гомологичному антигену была в 1,9 раза выше. У больных, проживающих на очаговых территориях, где первостепенное значение как резервуару вируса принадлежит *A. agrarius*, уровень титра антител к гемагглютинирующему антигену вируса *Far East* также был почти в 2 раза выше. При серотипировании сывороток крови 17 больных ГЛПС, зарегистрированных во Владивостоке, СГТ антител к гемагглютинирующему антигену *Seoul* составила 8,9 $\log_2$, а к антигенам *Far East* и *Amur* в 1,5 и 3 раза ниже соответственно (табл. 2).

Возможность типирования антигенов хантавирусов была изучена нами в реакции нейтрализации, т.к. к настоящему времени известно, что более высокие титры антител формируются к геноварианту, непосредственно вызвавшему заболевание [1].

В результате исследования сывороток крови от 60 больных из сельских районов Приморского края и г. Владивостока в 32 случаях заболевания по разнице титра антител установлена этиологическая роль вируса *Seoul*, в 19 случаях — вируса *Far East*. Количество сывороток с неустановленными и незначительно отличающимися титрами нейтрализующих антител равнялось 9. Среди 35 больных, зарегистрированных во Владивостоке, случаи заболевания, обусловленные вирусом *Seoul*, составили 82,9%, а вирусом *Far East* — 14,3%.

При изучении структуры генома хантавирусов было установлено наличие нейтрализующих эпитопов как на оболочечном гликопротеине G2, так и на нуклеокапсидном белке N [12]. Вследствие различия антигенных детерминант, а также возможной вариации аминокислотного состава белков оболочки вириона хантавируса, формирующиеся к ним специфические антитела, возможно, обладают различной нейтрализующей способностью, что находит отражение в клинической картине заболевания.

По данным ряда авторов [7, 15], титр нейтрализующих антител в сыворотках больных с тяжелым течением хантавирусной инфекции значительно ниже, чем при среднетяжелых и легких формах болезни, что подтверждает высокую способность нейтрализующих антител к связыванию и выведению вируса из организма. W. Fan et al. [8] отмечали низкие значения нейтрализующих антител у обследованных с легкой и тяжелой формами ГЛПС, в то же время у больных со среднетяжелой формой их титр был незначительно

Таблица 2
Уровень специфических антигемагглютининов у больных ГЛПС из разных районов края к гомо- и гетерологичному антигенам

Тип очага	Кол-во обследованных	СГТ специфических антител к антигенам, $\log_2$		
		Far East	Amur	Seoul
Степной	31	8,6 $\pm$ 0,29	4,6 $\pm$ 0,50	н/о
Лесной	32	4,3 $\pm$ 0,48	8,3 $\pm$ 0,34	н/о
Владивосток	17	5,5 $\pm$ 0,60	3,1 $\pm$ 1,20	8,9 $\pm$ 0,25

Примечание. Различие между СГТ антител к антигенам между *Far East* и *Amur*, *Far East* и *Seoul*, *Amur* и *Seoul* статистически значимо;

н/о — не определено.

Таблица 3
Динамика титров нейтрализующих антител у больных ГЛПС в зависимости от тяжести и периода болезни

Течение заболевания	СГТ антител в разные периоды болезни, $\log_2$		
	14–21-й день	22–30-й день	более 1 мес.
Тяжелое	7,5 $\pm$ 0,27	7,8 $\pm$ 0,63	7,0 $\pm$ 0,42
Среднетяжелое	7,5 $\pm$ 0,33	7,7 $\pm$ 0,40	8,2 $\pm$ 0,48
Легкое	8,0 $\pm$ 0,38*	7,7 $\pm$ 0,34	8,5 $\pm$ 0,53*

* Различия с тяжелой формой заболевания статистически значимы.

выше. Титр антител увеличивался в течение болезни, достигая максимума на 15–16-й день, и стабилизировался, однако авторы обнаружили нехарактерную динамику антителообразования у крайне тяжелых больных и в летальных случаях, что свидетельствует о возможном прогнозе заболевания и имеет большое клиническое значение.

Изучая динамику нейтрализующих антител у больных с различным клиническим течением инфекции, мы обнаружили их наличие к концу 2-й недели заболевания у 92% обследованных, к концу 3-й — у 96,8%, 4-й — у 98,4%. Величина титра нейтрализующих антител существенно не зависела от тяжести течения инфекции, однако более высокий титр отмечался у больных с легкими формами заболевания в период разгара болезни и фазу поздней реконвалесценции (табл. 3).

Таким образом, изучение гуморального иммунитета у больных ГЛПС дает возможность при исследовании сывороток больных в реакции торможения гемагглютинации в ранние сроки заболевания быстро получить информацию об участии определенных серотипов/генотипов хантавируса в эпидемическом процессе. С помощью выявления нейтрализующих антител можно получить окончательное заключение об этиологическом агенте, вызвавшем заболевание. Результаты нашего исследования сывороток крови, взятых в динамике заболевания, показали, что в отдельных случаях увеличение титра специфических

антител у больных ГЛПС отмечалось на фоне уменьшения тяжести заболевания.

Литература

1. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / под ред. Р.А. Слоновой, Е.А. Ткаченко, В.А. Иванис и др. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2006.
2. Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника, иммунокорректирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом в регионе циркуляции разных серотипов хантавирусов : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Владивосток, 2004.
3. Кушнарева Т.В. Гемагглютинирующие свойства хантавирусов и получение специфического диагностикума : автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2002.
4. Слонова Р.А., Кушнарева Т.В., Компанец Г.Г. и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2006. — № 3. — С. 74–77.
5. Ткаченко Е.А., Деконенко А.Е., Дзагурова Т.К. и др. // Хантавирусы и хантавирусные инфекции / под ред. Р.А. Слоновой, В.А. Иванис. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2003.
6. Arikava J., Lapenotiere H.F., Iacono-Connors L. et al. // *Virology*. — 1990. — Vol. 176, No. 1. — P. 114–125.
7. Bharadwaj M., Notchissey R., Goade D. et al. // *J. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 182. — P. 43–48.
8. Fan W., Zhang C., Nie Z. et al. // 2nd Inter. Conf. «Hemorrhagic fever with renal syndrome» : abstracts. — Beijing, China, 1992. — P. 34.
9. Lee P.W., Gibbs C.J., Gajdusek C. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1985. — Vol. 22, No. 9. — P. 940–944.
10. Liu Z., Fan W., Znanng C. // 2nd Inter. Conf. «Hemorrhagic fever with renal syndrome» : abstracts. — Beijing, China, 1992. — P. 35.
11. Lundkvist A., Kallio-Kokko H., Sjolander K.B. et al. // *Virology*. — 1996. — Vol. 15, iss. 216, No. 2. — P. 397–406.
12. Shmaljohn C.S. // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — Vol. 25, iss. 18, No. 22. — P. 6728.
13. Shmaljohn C.S., Jennings G.B., Hay G., Dalrymple J.M. // *Virology*. — 1986. — Vol. 155, No. 2. — P. 633–643.
14. Tang Y.W., Li Y.L., Ye K.L. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1991. — Vol. 29, No. 9. — P. 1924–1927.
15. Tang Y., Yang W., Bai X. // 2nd Inter. Conf. «Hemorrhagic fever with renal syndrome»:Abstracts. — Beijing, China, 1992. — P. 38.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

HUMORAL FACTORS OF THE IMMUNE ANSWER AT PATIENTS WITH HEMORRHAGIC FEVER WITH NEPHRITIC SYNDROME IN PRIMORSKI KRAI

I.G. Maksema, G.G. Kompanets, T.V. Kushnareva, R.A. Slonova
Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok)

Summary — Results of studying of changes of the anti-hemo-agglutinating and neutralization antibodies at patients with the hemorrhagic fever with nephritic syndrome are submitted. By results of reaction of braking of hemagglutination on occasion at patients with moderate infection the more expressed immune answer is revealed, especial in an initial stage of illness, as against severe forms. The importance of use of reaction of braking of hemagglutination for the information on participation of the certain serotypes/genotypes of hantavirus in epidemic process is shown. Changes of specific antibodies at patients with various forms of disease in reaction of neutralization is investigated. The level of antibodies titer essentially did not depend on severity; the tendency to its higher value at patients with easy forms of disease however was traced in peak of illness and a phase of recovery.

Key words: the hemorrhagic fever with nephritic syndrome, humoral immunity, serotype/genotype of hantavirus

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 79–82.

УДК 616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-036.22

О.В. Иунихина, Г.Г. Компанец, Р.А. Слонова

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ЗАРАЖЕНИЯ ХАНТАВИРУСАМИ

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, условия контакта с патогеном, тяжесть клинического течения.

Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ 530 историй болезни больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом за 1986–2006 гг. из очагов циркуляции вирусов Хантаан и Амур. Полученные данные показывают, что тяжесть клинического течения инфекции зависит от длительности и условий контакта с патогеном. Работа в условиях повышенного пылеобразования или длительное пребывание в лесу приводят к более тяжелому течению хантавирусной инфекции. Оценка профессиональной принадлежности больных и условий заражения позволили выделить группу повышенного риска заражения хантавирусной инфекцией в Приморском крае.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — широко распространенное в странах Евразии, в том числе на юге Дальнего Востока России, а также в сопредельных странах — Китае и Корее — природно-очаговое заболевание. В азиатском регионе нередко отмечаются тяжелые формы ГЛПС с высокой летальностью (от 0,5 до 12%), в основном обусловленные вирусом Хантаан [8, 15]. В европейских очагах хантавирусной инфекции случаи заболевания, обусловленные вирусом Пуумала, протекают значительно легче, и летальность здесь не превышает 0,02 %, в то же время в очагах циркуляции вируса Добrava у 12%