

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Хаметова К.М.¹, Алексеев К.П.¹, Южаков А.Г.¹, Костина Л.В.¹, Раев С.А.¹,
Мусяенко М.И.¹, Мухин А.Н.¹, Алипер Т.И.¹, Воркунова Г.К.¹, Гребенникова Т.В.^{1,2}

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛОНИРОВАННОГО ШТАММА WA РОТАВИРУСА А ЧЕЛОВЕКА

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи», Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия

Введение. Ротавирусы являются одной из главных причин возникновения тяжелых диарей у детей во всем мире. Единственным эффективным методом контроля уровня заболеваемости является вакцинация. В настоящее время для профилактики ротавирусной инфекции применяют вакцины, основанные на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого или животного происхождения. **Цели и задачи.** Изучение биологических и генетических свойств актуального эпидемического штамма Wa генотипа G1P[8] ротавируса А (РВА) человека. **Материал и методы.** Определение репродуктивной активности РВА в перевиваемых клеточных линиях, концентрирование и очистка антигена РВА, ПААГ-электрофорез и иммуноблот, электрофорез вирусных геномных РНК-сегментов, определение первичной нуклеотидной последовательности (секвенирование). **Результаты.** В статье представлены результаты изучения биологических и молекулярно-генетических свойств штамма Wa генотипа G1P[8] РВА человека для оценки его стабильности. Штамм РВА был адаптирован к репродукции в монослойной перевиваемой культуре клеток MARC145. Инфекционный титр вируса составил 7,5–7,7 lg ТЦИД₅₀/мл. Получен очищенный и концентрированный культуральный антиген РВА. Проведена оценка степени чистоты культурального антигена вируса методом ПААГ-электрофореза и иммуноблота. Для идентификации РВА был проведен электрофорез вирусных геномных РНК-сегментов. Отсутствие накопления изменений в геноме РВА Wa в ходе адаптации к различным клеточным культурам и при пассировании было показано методом секвенирования фрагментов вирусного генома. **Заключение.** В ходе проведенных исследований было установлено, что штамм Wa РВА – стабильный, обладает высокой биологической активностью: он хорошо репродуцировался в перевиваемых клеточных линиях, адаптация к клеточной линии MARC145 позволила получить титр 7,5–7,7 lg ТЦИД₅₀/мл. Подтверждена идентичность культивируемого РВА исходному штамму Wa G1P[8].

Ключевые слова: ротавирус А; вакцина против ротавирусной болезни; молекулярно-биологические свойства вируса.

Для цитирования: Хаметова К.М., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Костина Л.В., Раев С.А., Мусяенко М.И., Мухин А.Н., Алипер Т.И., Воркунова Г.К., Гребенникова Т.В. Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(1): 16-22.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22>

Khametova K.M.¹, Alekseev K.P.¹, Yuzhakov A.G.¹, Kostina L.V.¹, Raev S.A.¹, Musienko M.I.¹, Mukhin A.N.¹, Aliper T.I.¹, Vorkunova G.K.¹, Grebennikova T.V.^{1,2}

EVALUATION OF THE MOLECULAR-BIOLOGICAL PROPERTIES OF HUMAN ROTAVIRUS A STRAIN WA

¹Ivanovsky Virology Institute, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

²Peoples Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, 117198, Russian Federation

Introduction. Rotaviruses are among the leading causes of severe diarrhea in children all over the World. Vaccination is considered to be the most effective way to control the disease. Currently available vaccines for prevention of rotavirus infection are based on live attenuated rotavirus strains human or animal origin. **Objectives and purposes.** The aim of this investigation was to study the biological and genetic properties of an actual epidemic human rotavirus A (RVA) strain Wa G1P[8] genotype. **Material and methods.** RVA Wa reproduction in a monolayer continuous cell lines, purification and concentration of RVA antigen, PAAG electrophoresis and Western-Blot, electrophoresis of viral genomic RNA segments, sequencing. **Results.** Human RVA G1P[8] Wa strain biological and molecular genetic properties were assessed in the process of the adaptation to MARC145 continuous cell line. Cell cultured RVA antigen was purified, concentrated and then characterized by the method of PAAG electrophoresis and immunoblot. To verify RVA Wa genome identity, electrophoresis of viral genomic RNA segments was performed. The lack of accumulation of changes in the RVA Wa genome during adaptation to various cell cultures and during serial passages was demonstrated by sequencing fragments of the viral genome. **Conclusion.** RVA Wa strain is stable, it possesses high biological activity: it has been successfully adapted to the MARC145 cell line and RVA Wa virus titer after the adaptation reached 7,5-7,7 lg TCID₅₀/ml. The identity of the cultivated RVA to the original strain Wa G1P[8] was confirmed.

Keywords: rotavirus A; vaccine against rotavirus disease, molecular biological properties of the virus.

Для корреспонденции: Хаметова Кизхалум Маликовна, научный сотрудник лаборатории средств специфической профилактики вирусных болезней ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. 123098, г. Москва. E-mail: kizkhalum@yandex.ru

For citation: Khametova K.M., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Kostina L.V., Raev S.A., Musienko M.I., Mukhin A.N., Aliper T.I., Vorkunova G.K., Grebennikova T.V. Evaluation of the molecularbiological properties of human rotavirus A strain WA. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(1): 16-22. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22>

For correspondence: Kizhalum M. Khametova, Research Fellow, Laboratory for Specific Prevention of Viral Diseases Ivanovsky Virology Institute, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F.Gamaleya», Moscow. 123098, Russian Federation. E-mail: kizkhalum@yandex.ru

Information about authors:

Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Khametova K.M., <https://orcid.org/0000-0002-8461-600X>

Yuzhakov A.G., <https://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Mukhin A.N., <https://orcid.org/0000-0001-7008-5212>

Aliper T.I., <https://orcid.org/0000-0002-5876-2425>

Alekseev K.P., <https://orcid.org/0000-0001-9536-3127>

Costina L.V., <https://orcid.org/0000-0002-9556-1454>

Acknowledgments. The publication was prepared with the support of the “RUDN University Program 5-100”.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 15 October 2018

Accepted 31 October 2018

Введение

В настоящее время ротавирусы (РВ) являются одной из основных причин тяжелых форм острых кишечных инфекций (ОКИ) у детей в возрасте от 3 до 5 лет [1–3].

Эпидемиология ротавирусной инфекции (РВИ) имеет региональные особенности. В странах с низким уровнем развития экономики и здравоохранения бремя тяжелых диарейных заболеваний, вызванных РВ, наиболее ощутимо. Так, доля всех ротавирусных госпитализаций у детей в возрасте до 5 лет составляет 43% в Африке и 27% в Европе [4]. Подавляющее большинство летальных случаев регистрируют в странах Африки и Юго-Восточной Азии [5, 6]. Если доля смертельных диарей, связанных с РВ, во всем мире составляет 30–50%, то в этих странах – более 90%.

На территории Российской Федерации доля ротавирусных гастроэнтеритов тоже достигает достаточно внушительных цифр – 44–47% от всех случаев инфекционной кишечной патологии. При этом до 5% всей детской смертности среди больших младше 5 лет связаны с ротавирусным гастроэнтеритом [7,8].

РВ относят к семейству *Reoviridae*. РВ являются безоболочечными вирусами, имеющими сложную архитектуру вириона, который состоит из трех концентрических капсидов, окружающих 11 сегментов двухцепочечной РНК [9]. Сегменты РНК кодируют 6 структурных вирусных белков (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7) и 6 неструктурных белков (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 и NSP6). Структурные белки определяют процесс адсорбции вируса и его проникновения в эпителиальные клетки, участвуют в последующей транскрипции вирусной РНК, содержат эпитопы, которые индуцируют иммунный ответ. Неструктурные белки участвуют в репликации генома и регуляции врожденного иммунного ответа. Неструктурный пептид NSP4 обладает энтеротоксическими свойствами и принимает непосредственное участие в развитии диареи по секреторному типу [10].

Структурный белок VP6 является основной группоспецифичной антигенной детерминантой РВ [11, 12]. В зависимости от его строения РВ подразделяют на 10 видов, или серологических групп (А–J) [13, 14]. В 98% случаев РВИ у человека вызывают РВА, составляющие весомую долю в этиологии диареи у детей в возрасте до 5 лет [9, 15–17]. РВА далее подразделяют на различные генотипы на основе особенностей структуры гена VP7. Антигенные особенности белков VP4 и структура гена VP7 составляют основу двойной номенклатурной системы, используемой для штаммов РВА: по VP7 РВА

разделяют на G-типы, а по VP4 – на P-типы. На сегодняшний день известно 32 G-генотипа и 47 P-генотипов РВ А [18]. Среди них в мире наиболее распространены 6 G-типов (G1, G2, G3, G4, G9 и G12) и 3 P-типа (P[4], P[6] и P[8]) [19, 20]. На глобальном уровне большинство ротавирусных инфекций у человека связано с генотипами G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [3, 21, 22]. Особенностью эпидемиологической обстановки в Российской Федерации в последние годы было преобладание штаммов G4P[8] [3, 23]. Интересно, что последние данные по распространению типов РВА в Оренбургском регионе за 2013–2016 и 2016–2017 гг. показали появление штаммов G9P[8] и стремительное вытеснение этими штаммами ранее более распространенных типов: в 2016–2017 годы в Оренбургском регионе 54,7% случаев РВИ были ассоциированы со штаммами G9P[8]. Ранее штаммы G9P[8] стали преобладающим типом РВА на территории Китая [24–26].

В настоящее время единственным эффективным методом контроля уровня заболеваемости признается вакцинация [27]. Внедрение ротавирусных вакцин существенно сократило количество случаев госпитализаций от РВИ. Для специфической профилактики ротавирусной инфекции разработаны вакцины, которые показали свою эффективность для предотвращения тяжелых ротавирусных гастроэнтеритов. В настоящее время более чем в 100 странах мира для использования лицензированы две живые аттенуированные вакцины: моновалентная Rotarix (GlaxoSmithKline, Бельгия) на основе аттенуированного РВА человека типа G1P[8] и пентавалентная RotaTeq (Merk & Co, США), которая является реассортантом РВА крупного рогатого скота (КРС) и человека, включая VP7 типов G1, G2, G3, G4 и VP4 типа P[8] [28]. Кроме того, две индийские вакцины проходят III стадию клинических испытаний и включены в последний информационный лист ВОЗ по ротавирусным вакцинам [29]. Rotavac компании Bharat является моновалентной вакциной на основе живого аттенуированного штамма 116E РВА человека типа G9P[11], выделенного от ребенка без клинических симптомов и содержащего VP4 от РВА КРС, полученного, видимо, в результате реассортации [30]. Rotasiil разработан Serum institute of India и является реассортантом РВА КРС и человека, включая VP7 типов G1, G2, G3, G4 и G9.

Несмотря на эффективность применения указанных вакцинных препаратов в развитых странах, их использование остается связано с риском образования спаек в кишечнике. Хотя частота осложнения, связанного с вакциной, не превышает 1:50 000 [31], для развитых стран,

где летальность ротавирусной диареи не превышает 1:100 000 [32], такая частота осложнений по-прежнему остается серьезной проблемой. Второй серьезной проблемой остается образование штаммов-реассортантов на основе вакцинного и полевых РВ, что вызывает вопросы о безопасности применения живых вакцин [33, 34].

РВ поражают как человека, так и основных сельскохозяйственных животных: КРС, свиней [35]. Показано, что РВА человека способны поражать новорожденных поросят [36], а РВА КРС, напротив, были выделены от новорожденных детей [37]. Сегментированный геном РВ, позволяющий легкую реассортацию полевых штаммов ротавируса при коинфекции одного хозяина, дополнительно усиливает антропозоонозный потенциал РВА. Эта особенность РВА дополнительно подчеркивает важность вопроса биобезопасности при применении живых вакцин. Поросята-гнотобиоты или безмолозивные поросята являются уникальной моделью для изучения эффективности новых вакцинных препаратов против ротавирусной инфекции [38]. Плацента свиньи не пропускает антитела, и новорожденные поросята лишены материнских антител [39, 40]. Они сохраняют чувствительность к заражению человеческими штаммами РВ до возраста 8 недель, что достаточно для проведения испытаний вакцины [41], в отличие от грызунов, которые чувствительны к заражению лишь до 14–21-го дня [42, 43].

Целью нашей работы было изучение биологических и генетических свойств штамма Wa G1P[8] РВА человека, который является актуальным эпидемическим штаммом и в дальнейшем может быть использован в качестве вакцинного препарата.

Материал и методы

Вирус. В работе был использован аттенуированный штамм Wa G1P[8] ротавируса А человека, любезно предоставленный профессором Linda J. Saif (OARDC, FAHRP, университет штата Огайо, США). Образец фекалий больного ребенка был использован для орального заражения поросят-гнотобиотов. После 11 пассажей на поросятах-гнотобиотах вирус был адаптирован к культуре клеток MA104 и выделен методом бляшкообразования. Полученный вирус был клонирован методом предельных разведений 6 раз, после чего было сделано 27 пассажей вируса на культуре клеток MA104. 27-й пассаж вируса на MA104 использовали как сток аттенуированного вируса [44, 45].

Клетки и культивирование вируса. Для изучения культуральных свойств вируса были использованы культуры перевиваемых клеточных линий PK-15 (почка свиньи), СПЭВ (почка эмбриона свиньи), MARC145 (почка эмбриона зеленой мартышки), MA104 (почка эмбриона зеленой мартышки). Клетки выращивали в монослое, применяя методы стационарного культивирования. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с L-глутамином (Sigma, Германия) в присутствии 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США). Двухсуточный монослой (80–90%) используемых клеточных линий дважды промывали солевым раствором Хэнкса, инокулировали 5 мл вирусной суспензии (из расчета 0,1 ТЦИД₅₀/мл) и инкубировали 1 ч при 37 °С для адсорбции вируса. После этого монослой снова промывали раствором Хэнкса и вносили поддерживающую среду ДМЕМ, содержащую 5 мкг/мл трипсина (Sigma, Германия). Клетки наблюдали 4–5 суток до появления признаков цитопатического действия (ЦПД).

Определение инфекционной активности РВА. Для определения инфекционной активности вируса был использован метод титрования в культуре клеток MA104 и MARC145. Значение инфекционного титра вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в Ig ТЦИД₅₀/мл.

Концентрирование и очистка антигена РВА. Вирусную суспензию подвергали трехкратному замораживанию и оттаиванию с последующим низкоскоростным центрифугированием (3000 g) в течение 30 минут для освобождения от клеточного детрита. После этого проводили концентрирование с помощью осаждения 7,5% полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 в присутствии 20% NaCl и 0,2% NaN₃ и инкубировали при +4 °С в течении 72 часов.

Далее, осажденную вирусосодержащую жидкость центрифугировали при 8000 g, осадок растворяли в растворе Хэнкса и наслаивали на градиент плотности хлористого цезия (1,44–1,21 г/см³). После центрифугирования при 10000 g в течении 2-х часов, вирусную зону в центре образовавшегося градиента собирали с помощью шприца, диализировали против солевого раствора Хэнкса и хранили при -20 °С.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для подтверждения наличия РВА Wa в вирусосодержащем материале использовали коммерческую тест-систему, позволяющую выявлять РВА в биологическом материале животных и человека (ООО «Ветбиохим», Россия).

Выделение РНК РВА и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР). РНК РВА выделяли из пробы культурального вируса, с использованием соответствующего набора с неорганическим сорбентом (ООО «Ветбиохим», Россия), по методике производителя. Для проведения ПЦР и последующего секвенирования участков генов VP4, VP6 и VP7 РВА использовали набор специфических олигонуклеотидов, рекомендованных ВОЗ (табл. 1). Олигонуклеотидные праймеры синтезированы в ООО «ДНК Синтез» (Москва).

ПЦР, совмещенную с реакцией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), проводили в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл РНК, 10 пМ каждого праймера, 10 пМ каждого зонда, 0,25 мМ каждого dNTP, 1,25 ед. Taq-полимеразы, 0,5 ед. ревертазы M-MLV, 20 ед. ингибитора рибонуклеаз RNAzin, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 10 пМ DTT, 1,5 мМ MgCl₂.

Для проведения ПЦР был установлен оптимальный температурно-временной режим: 1 цикл: 50 °С – 30 минут, 94 °С – 5 минут; 30 циклов: 94 °С – 10 секунд, 50 °С – 20 секунд, 72 °С – 30 секунд; 1 цикл: 72 °С – 5 минут.

Горизонтальный электрофорез. Анализ фрагментов ДНК РВА, полученных методом ПЦР, проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле. Электрофорез проводили с использованием трис-ацетатного буфера (pH 8,5), содержащего бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл, при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30 минут. Гели просматривали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Нарботанные фрагменты вырезали из геля и выделяли, с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов (Thermo Fisher Scientific, США) по методике производителя.

Определение нуклеотидных последовательностей. Для секвенирования ДНК РВА по двум цепям использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР. Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера при помощи секвенирования ПЦР-продукта с использованием набора Big Dye Terminator Cycle Se-

Таблица 1

Перечень праймеров, использованных в работе, для генотипирования штамма Wa RVA человека [46]

Название праймера	Последовательность праймера	Размер фрагмента, пар нуклеотидов
RotaVP7-F	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	881
RotaVP7-R	AACYTGCCACCATTGTTTCC	
RotaVP4 Con3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	876
RotaVP4 Con2	ATTTCGGACCATTATAACC	
RotaVP6-F	GACGGVGCRACTACATGGT	379
RotaVP6-R	GTCCAATTCATNCCTGGTGG	

quencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя. Электрофорез ДНК осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакетов программ BioEdit (version 7.0.0) и программы SeqMap из пакета программ Lasergene (version 7.1.0).

Электрофорез и иммуноблоттинг. Анализ структурных белков антигена RVA проводили методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) по методу Laemmli (1970). Электрофорез проводили в пластинах ПААГ размером $70 \times 100 \times 0,75$ см на приборе Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, США) в восстанавливающих условиях при постоянном напряжении 200 V. Разделяющий гель содержал 12% акриламида, 0,5% N,N-метилен-бис-акриламида, 0,375 M трис-HCl (pH 8,8) и 0,1% ДСН. Фокусирующий гель содержал 4% акриламида, 10% N,N-метилен-бисакриламида в 0,125 M трис-HCl буфере (pH 6,8). Для полимеризации в оба геля вносили по 0,025% персульфата аммония и 0,075% TEMED. Электродный буфер содержал 0,025 M трис-HCl, 0,192 M глицина, pH 8,3 и 0,1% ДСН. Все испытуемые пробы содержали лизирующий буфер с восстановителем (0,125 M трис-HCl, pH 6,8, 5% ДСН, 0,5% β -меркаптоэтанола, 10,8% глицерина, 0,01% бромфенолового синего) и были прогреты в течение 5 минут при 100 °C. Заливку геля и подготовку аппарата для электрофореза к работе проводили согласно рекомендациям изготовителя. Белки в гелях окрашивали в течение 1 часа 0,1% раствором Кумасси ярко-голубого (СВВ R-350) в водном растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 30% метанола. Избыток красителя отмывали 10% раствором уксусной кислоты такое же время с несколькими его сменами. В качестве маркера молекулярной массы использовали коммерческий предокрашенный маркер 26619 (ThermoFisher Scientific, США).

Для определения антигенной активности структурных белков антигена RVA использовали иммуноблоттинг (ИБ). Для постановки ИБ белки после электрофоретического разделения не окрашивали, а переносили на нитроцеллюлозную мембрану Immobilon-NC (Millipore, США) в «полусухой» буферной системе (Kuhse-Andersen J., 1984) на приборе Bio-Rad (США) при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 часа при комнатной температуре согласно методике производителя. Буфер для переноса содержал 0,025 M трис-HCl, 0,193 M глицина, 20% метанола (pH 8,35). Эффективность переноса оценивали после окраски одной мембраны-реплики 0,1% раствором амидо-черного, а соответствующего ей геля

– СВВ R-350. Иммунохимическое окрашивание полученных реплик осуществляли с помощью непрямого варианта ИФА с соблюдением всех его стадий. Несвязавшиеся с белками участки нитроцеллюлозы блокировали инкубированием в фосфатно-солевом буферном растворе с твином (ФСБТ), содержащем 3% Tor Block (Yugo, Швейцария) в течение 16 часов при +4 °C. После этого мембраны отмывали 4 раза в ФСБТ и 4 раза в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) и инкубировали с козьей антисывороткой к RVA меченой пероксидазой хрена, в разведении 1 : 500 и 1 : 2000 в течение 1 часа при 37 °C. Мембраны отмывали 4 раза в течение 10 мин ФСБТ. Визуализацию комплекса антиген–антитело проводили путем обработки мембраны 3,3'-диаминобензидином (0,05% раствор ФСБ с 0,01% H₂O₂) [47, 48].

Электрофорез итамов ротавируса. Электрофорез штаммов ротавируса включает в себя несколько этапов: выделение РНК из исследуемого материала, электрофорез в ПААГ, визуализацию РНК в геле. Экстракцию РНК осуществляли фенол/хлороформной смесью. Электрофорез проводили в ПААГ в системе буферных растворов с окрашиванием РНК нитратом серебра. На гель наносили 0,75 мкл РНК, предварительно обработанного 2-кратным диссоциирующим буфером и прогретого при 68 °C в течение 5 минут. Разделение материала проводили в 0,1% ПААГ в течение 16 часов при силе тока 12 мА, в присутствии 0,1% SDS, в стандартной триглицериновой системе. После электрофореза пластину трижды по 10 мин промывали от SDS раствором, содержащим 10% этанола и 0,3% уксусной кислоты. Затем помещали на 5 мин в 0,3% азотную кислоту. Окрашивали исследуемую РНК 0,2% раствором нитрата серебра в течение 30 мин. Для проявления полос окрашенной РНК использовали раствор, содержащий 0,2M карбоната натрия и 0,5% формальдегида. Фиксацию окрашенных полос РНК проводили 1% раствором уксусной кислоты.

Результаты

Для адаптации и изучения репродуктивной активности RVA была проведена сокультивация образцов RVA в присутствии трипсина с перевиваемыми клеточными линиями РК-15, СПЭВ, МА104 и MARC145. Наблюдение вели в течение 4–5 суток, отслеживая вирусиндуцированный цитолиз и цитопатическое действие (ЦПД) RVA в клеточном монослое.

На первом пассаже, который длился 5 суток, ЦПД вируса обнаружено не было. На втором пассажном уровне через 72 часа первые признаки ЦПД наблюдали на 20–40% площади монослоя клеточных линий МА104 и MARC145. ЦПД характеризовалось округлением клеток, образованием небольших конгломератов, от которых исходили тяжи. Через 96 часов после внесения вирусного материала, ЦПД вируса охватило уже почти всю площадь клеточного монослоя (80–90%). На 5-е сутки сокультивации наблюдалась дегенерация клеточного монослоя и отторжения клеток от пластика, как в случае с МА104, так и в случае с MARC145. После 5 последовательных пассажей ЦПД RVA в культурах клеток РК-15 и СПЭВ обнаружено не было. Поэтому для дальнейшей работы по изучению репликативной активности и цитопатогенности RVA использовали клеточные линии МА104 и MARC145, в которых впоследствии было проведено 20 последовательных пассажей вируса. Результаты по определению инфекционной активности RVA в пробах 2–20 пассажей приведены в табл. 2.

Таблица 2

Репродукция аттенуированного штамма Wa PBA человека в перевиваемых культурах клеток MA-104 и MARC-145*

№ Пассажа	Культура клеток	
	MA-104	MARC-145
	Инфекционная активность, lg ТЦИД _{50/мл}	
2	4,50	5,50
3	4,66	5,50
4	5,50	6,00
5	5,50	6,23
6	5,66	6,33
7	5,76	6,50
8	5,83	6,50
9	6,00	6,50
10	6,00	6,66
11	6,48	6,76
12	6,50	7,00
13	6,50	7,23
14	6,50	7,23
15	6,66	7,33
16	6,66	7,50
17	6,66	7,50
18	6,66	7,66
19	6,66	7,50
20	6,50	7,50

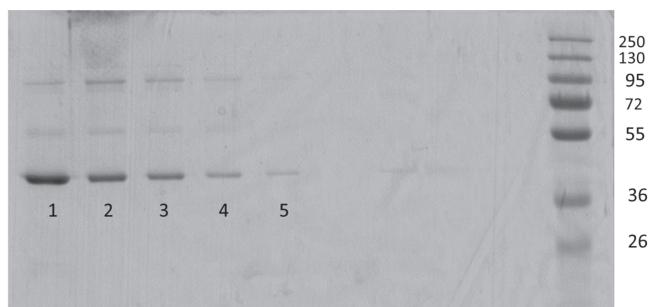
Примечание. * Приведены среднегеометрические значения трех повторностей; ** – максимальное значение инфекционного титра вируса (выделено серым).

Как видно из данных табл. 2 в процессе пассирования PBA в культурах клеток MA104 и MARC145 наблюдалось постепенное увеличение инфекционной активности вируса. Максимальное значение инфекционного титра PBA было зафиксировано в пробах 18 пассажа. При этом в культуре клеток MARC145 он был на один логарифм выше, чем в культуре клеток MA104. Полученные данные свидетельствуют о том, что произошла адаптация исследуемого нами штамма PBA к перевиваемой клеточной линии MARC145. Проба с титром 7, 66 lg ТЦИД_{50/мл} была использована для получения очищенного препарата PBA, ПЦР и секвенирования.

Далее, в результате используемой технологии концентрирования и очистки культурального вируса был получен электрофоретически чистый препарат антигена PBA с концентрацией белка 1 мг/мл, (рис. 1). Наличие PBA в пробах исходного и очищенного препаратов было подтверждено методами ИФА и ОТ-ПЦР.

Результаты иммуноблоттинга по определению антигенной активности структурных белков антигена PBA показали, что используемая поликлональная гипериммунная сыворотка давала видимую специфическую полосу окрашивания в области 41 кДа, что соответствует молекулярной массе белка VP6 вируса (рис. 2). Проведенный электрофорез для типирования PBA, основанный на анализе профиля распределения 11 сегментов двунитевой РНК ротавирусного генома показал, что штамм Wa G1P[8] PBA человека имел распределение сегментов, типичное для PBA (рис. 3).

Определение специфической и видовой принадлежности штамма PBA проводили методами ПЦР и секвенирования. При определении идентичности исследуемого



1-5 – двукратные разведения очищенного ротавируса, начиная с исходного.

Рис. 1. Электрофоретический анализ структурного состава белков штамма Wa PBA человека.

1-5 – двукратные разведения очищенного ротавируса начиная с исходного.

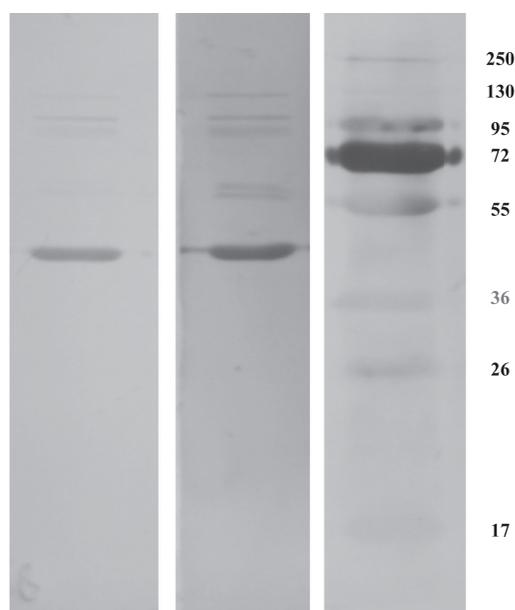


Рис. 2. Определение антигенной активности белков штамма Wa PBA человека в иммуноблоттинге с конъюгированной PBA-специфической антисывороткой козы.

1 – разведение конъюгата 1 : 2000; 2 – разведение конъюгата 1 : 500.

нами штамма PBA человека последовательность, установленную при секвенировании фрагмента, полученного в ПЦР, сравнивали с нуклеотидными последовательностями области генома штамма вируса из биоинформационной системы GenBank. Анализ полученных результатов показал, что адаптированный нами к репликации в клеточной линии MARC145 вирус не отличался от исходного штамма PBA человека группы A Wa G1P[8].

Обсуждение

Характеристика биологических и генетических свойств штаммов PBA человека представляет большой интерес для понимания эпидемиологического процесса и поиска средств борьбы с этой инфекцией, а также для создания и оценки эффективности кандидатных вакцинных препаратов. В настоящее время на мировом рынке доступны 2 вакцины на основе живого аттенуированного штамма PBA. Различия между существующими вакцина-

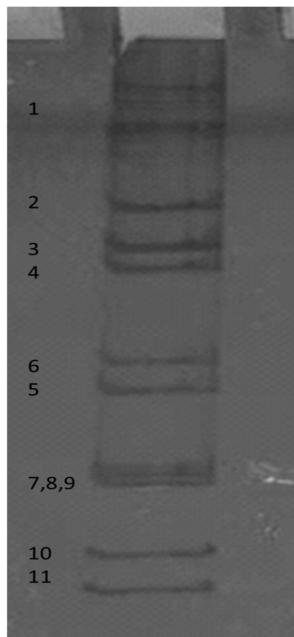


Рис. 3. Распределение сегментов РНК генома штамма Wa РВА человека.

ми заключаются в рекомендуемом режиме вакцинации и антигенном составе. Моновалентная вакцина создана на основе аттенуированного человеческого штамма РВ G1P1A[8]. В состав пентавалентной вакцины входит бычий РВ штамма SW3 генотипа (G6P7[5]), дополненный генами G1, G2, G3, G4 и P1A[8] человека. Анализ результатов применения вакцин показал эффективность моно- и пентавалентных ротавирусных препаратов против тяжелых форм ротавирусного гастроэнтерита, в частности, снижение числа случаев смерти от ротавирусного гастроэнтерита. В зависимости от типа вакцин эффективность значительно не различалась. Так, например, эффективность моновалентной вакцины в странах с низкой, средней и высокой детской смертностью составила 84%, 75% и 57% соответственно. Поливалентная вакцина обеспечила защиту от РВИ на 90% в странах с низким уровнем смертности и на 45% - в странах с высоким уровнем детской смертности. В состав моновалентной вакцины входит всего один серотип РВ, но на иммуногенность и уровень защиты это не влияет [27,31]. В связи с этим, предпосылкой для создания новых кандидатных вакцин, является использование человеческого штамма РВА с высокой инфекционной активностью, циркулирующего на территории их применения.

В результате сравнения различных вариантов заражения ротавирусом клеточных культур РК-15, СПЭВ, МА104 и MARC145, исследования кинетики накопления вируса на различных культурах, а также проведения серии пассажей РВА Wa, было установлено, что оптимальное накопление вируса происходит на клеточной культуре MARC145, которая не является часто используемой для накопления РВА клеточной линией. Для наращивания РВА Wa обычно используют культуру клеток МА104, однако нам удалось получить более высокие титры вируса на культуре клеток MARC145. Таким образом, РВА Wa был адаптирован к культивированию на новой клеточной линии, позволяющей повысить накопление вируса по

сравнению с обычным наращиванием на МА104.

Учитывая высокую степень изменчивости РНК-генома ротавирусов, было крайне важно убедиться, что в процессе пассирования на новой для него культуре клеток, РВА Wa сохранил свои молекулярно-биологические свойства. Для этого нами было проведено определение нуклеотидной последовательности фрагментов генома РВА Wa. Полученные данные свидетельствуют о том, что вирус сохранил свои свойства, не изменившись в процессе пассирования на культуре клеток MARC145.

Идентичность культивируемого нами вируса РВА была так же подтверждена методами электрофореза в ПААГ-ДСН и РНК-электрофореза с окрашиванием сегментов вирусного генома. По структурному составу вирусных белков и сегментов вирусного генома культивируемый нами штамм соответствовал РВА, а белок VP6 вируса специфически взаимодействовал с РВА-положительной антисывороткой в ИБ.

Заключение

Таким образом, резюмируя полученные результаты и имеющиеся данные, можно сделать общее заключение о том, что исследуемый нами штамм вируса демонстрирует все свойства, характерные для РВА, не претерпел изменений по сравнению с исходным штаммом РВА Wa, имеет высокую биологическую активность при культивировании в клеточной линии MARC145. На фоне успешного опыта применения моновалентной вакцины Rotarix в десятках стран и успешных испытаний моновалентной вакцины Rotavac в Индии, можно рассматривать адаптированный нами к культуре клеток MARC145 аттенуированный РВА Wa как потенциальный кандидатный штамм для разработки отечественной моновалентной живой аттенуированной вакцины против РВИ.

Финансирование. Публикация подготовлена при поддержке Программы «5-100».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4-6, 9, 11-14, 16-22, 25, 26, 28-48 см. REFERENCES)

- Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Ротавирусная инфекция человека. Стратегии вакцинопрофилактики. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(3): 154-9.
- Колпаков С.А., Колпакова Е.П. Адаптация штаммов ротавируса человека группы А и репродукция на перевиваемых культурах клеток. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(3): 138-43.
- Бахтияров Г.Н., Лободанов С.А., Марова А.А., Мескина Е.Р., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Определение генетической структуры ротавирусов группы А, циркулирующих в Московском регионе, методом ПЦР в режиме реального времени. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2012; 67(3): 35-9.
- Лукьянова А.М., Бехтерева М.К., Птичникова Н.Н. Клинико-эпидемиологическая характеристика вирусных диарей у детей. *Журнал инфектологии.* 2014; 6(1): 60-6.
- Кондакова О.А., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* 2017; 72(4): 199-208.
- Зайцева Е.В., Ольнева Т.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Шипулин Г.А., Кондратьева Л.М. и др. Результаты мониторинга антигенных типов ротавирусов гр. А на территории Российской Федерации в период 2011—2015 гг. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(7): 445-8. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-445-448
- Денисюк Н.Б. Генетическая характеристика ротавирусов группы А, циркулирующих в Оренбургском регионе в сезон 2016—2017 гг. *Детские инфекции.* 2017; 16(4): 42-5.
- Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Вишнёва Е.А., Федосеев М.В., Селимзянова Л.Р. и др. Ротавирусная инфекция у детей — нерешенная проблема. Обзор рекомендаций по вакцинопрофилактике. *Педиатрическая фармакология.* 2017; 14(4): 248-57. doi:10.15690/pf.v14i4.1756

REFERENCES

- Walker C.L.F., Rudan I., Liu L., Nair H., Theodoratou E., Bhutta Z.A., et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet*. 2013; 381(9875): 1405-16. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60222-6
- Liu L., Oza S., Hogan D., Perin J., Rudan I., Lawn J.E., et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. 2015; 385(9966): 430-40. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61698-6
- Alekseev K.P., Kal'nov S.L., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Human rotavirus infection. Strategies for the vaccinal prevention. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(3): 154-9. (in Russian)
- Sanderson C., Clark A., Taylor D., Bolanos B. Global review of rotavirus morbidity and mortality data by age and region. WHO; 2011. Available at: https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2012/april/Sanderson_et_al_SAGE_April_rotavirus.pdf
- Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Parashar U.D. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62(Suppl. 2): S96-S105. doi: 10.1093/cid/civ1013
- Gurwith M., Wenman W., Hinde D., Feltham S., Greenberg H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *J. Infect. Dis.* 1981; 144(3): 218-24.
- Kolpakov S.A., Kolpakova E.P. Adaptation of human rotavirus strains of group A to the reproduction in passaged cell cultures. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(3): 138-43. (in Russian)
- Bakhtoyarov G.N., Lobodanov S.A., Marova A.A., Meskina E.R., Zverev V.V., Fayzuloev E.B. Determination of the Genetic Structure of Group A Rotaviruses Circulating in the Moscow Region, by PCR in Real Time. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2012; 67(3): 35-9. (in Russian)
- Crawford S.E., Ramani S., Tate J.E., Parashar U.D., Svensson L., Hagbom M., et al. Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017; 3: 17083. doi: 10.1038/nrdp.2017.83
- Luk'yanova A.M., Bekhtereva M.K., Ptichnikova N.N. Clinical and epidemiological characteristic viral diarrhea in children. *Zhurnal infektologii*. 2014; 6(1): 60-6. (in Russian)
- Kotloff K.L., Nataro J.P., Blackwelder W.C., Nasrin D., Farag T., Panchalingam S., et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the global multicenter study, GEMS): a prospective, case control study. *Lancet*. 2013; 382(9888): 209-22. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2
- Matthijnsens J., Otto P.H., Ciarlet M., Desselberger U., Van Ranst M., Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 2012; 157(6): 1177-82. doi: 10.1007/s00705-012-1273-3
- Bhat S., Kattoor J., Malik Y., Sircar S., Deol P., Rawat V., et al. Species C Rotaviruses in Children with Diarrhea in India, 2010-2013: A Potentially Neglected Cause of Acute Gastroenteritis. *Pathogens*. 2018; 7(1): 1-14. doi: 10.3390/pathogens7010023
- Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2013: 1347-401.
- Kondakova O.A., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Atabekov I.G., Karpova O.V. Rotavirus vaccines: new strategies and approaches. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2017; 72(4): 199-208. (in Russian)
- Parashar U.D., Hummelman E.G., Bresee J.S., Miller M.A., Glass R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(5): 565-72.
- Walker C.L., Taneja S., LeFevre A., Black R.E., Mazumder S. Appropriate Management of Acute Diarrhea in Children Among Public and Private Providers in Gujarat, India: A Cross-Sectional Survey. *Glob. Health Sci. Pract.* 2015; 3(2): 230-41. doi: 10.9745/GHSP-D-14-00209
- Rotavirus Classification Working Group: RCWG. KU Leuven Laboratory of Viral Metagenomics. 2017. Available at: <https://rega.kuleuven.be/cevl/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
- Matthijnsens J., Bilcke J., Ciarlet M., Martella V., Banyai K., Rahman M., et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009; 4(10): 1303-16. doi: 10.2217/fmb.09.96
- Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29-56. doi: 10.1002/rmv.448
- Gentsch J.R., Laird A.R., Bielfelt B., Griffin D.D., Banyai K., Ramachandran M., et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(Suppl. 1): S146-59. doi: 10.1086/431499
- Matthijnsens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(10): 2431-6. doi: 10.1093/molbev/msq137
- Zaytseva E.V., Of'neva T.A., Kuleshov K.V., Podkolzin A.T., Shipulin G.A., Kondrat'eva L.M., et al. The results of monitoring of antigen types of rotaviruses of group A on the territory of the Russian Federation in 2011-2015. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(7): 445-8. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-445-448 (in Russian)
- Denisyuk N.B. Genetic characteristics of Group A rotaviruses circulating in the Orenburg region in season 2016-2017. *Detskije infektsii*. 2017; 16(4): 42-5. (in Russian)
- Zhang J., Liu H., Jia L., Payne D.C., Hall A.J., Xu Z., et al. Active, population-based surveillance for rotavirus gastroenteritis in Chinese children: Beijing Municipality and Gansu Province, China. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2015; 34(1): 40-6. doi: 10.1097/INF.0000000000000505
- Liu N., Xu Z., Li D., Zhang G., Wang H., Duan Z.J. Update on the disease burden and circulating strains of rotavirus in China: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2014; 32(35): 4369-75. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.018
- Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Tatochenko V.K., Vishneva E.A., Fedoseenko M.V., Selimzyanova L.R., et al. Rotavirus Infection in Children is an Unsolved Problem Review of Guidelines for Vaccinal Prevention. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2017; 14(4): 248-57. <https://doi.org/10.15690/pf.v14i4.1756> (in Russian)
- Xue M., Yu L., Che Y., Lin H., Zeng Y., Fang M., et al. Characterization and protective efficacy in animal model of novel truncated rotavirus VP8 subunit parenteral vaccine candidate. *Vaccine*. 2015; 33(22): 2606-13. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.068
- World Health Organization. Information sheet. Observed rate of vaccine reactions – Rotavirus Vaccine. 2018. Available at: https://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/Rotavirus_vaccine_rates_information_sheet_0618.pdf
- Rippinger C.M., Patton J.T., McDonald S.M. Complete genome sequence analysis of candidate human rotavirus vaccine strains RV3 and 116E. *Virology*. 2010; 405(1): 201-13. doi: 10.1016/j.virol.2010.06.005
- Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res.* 2014; 190: 75-96. doi: 10.1016/j.virusres.2014.06.016
- WHO. Rotavirus vaccines: an update. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2012; 84(51-52): 533-37.
- Bucardo F., Rippinger C.M., Svensson L., Patton J.T. Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12(6): 1282-94. doi: 10.1016/j.meegid.2012.03.007
- Hemming M., Vesikari T. Detection of rotateq vaccine-derived, double-reassortant rotavirus in a 7-year-old child with acute gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014; 33(6): 655-6. doi: 10.1097/INF.0000000000000221
- Soma J., Tsunemitsu H., Miyamoto T., Suzuki G., Sasaki T., Suzuki T. Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strains: Shintoku and Toyama. *J. Gen. Virol.* 2013; 94(Pt. 1): 128-35. doi: 10.1099/vir.0.046763-0
- Ward L.A., Rosen B.I., Yuan L., Saif L.J. Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J. Gen. Virol.* 1996; 77(Pt. 7): 1431-41. doi: 10.1099/0022-1317-77-7-1431
- Ghosh S., Alam M.M., Ahmed M.U., Talukdar R.I., Paul S.K., Kobayashi N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt. 9): 2367-73. doi: 10.1099/vir.0.022244-0
- Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev. Vaccines*. 2013; 12(2): 169-81. doi: 10.1586/erv.13.3
- Friess A.E., Sinowatz F., Skolek-Winnisch R., Trütner W. The placenta of the pig. II. The ultrastructure of the areolae. *Anat. Embryol. (Berl.)* 1981; 163(1): 43-53.
- Lala P.K., Chatterjee-Hasrouni S., Kearns M., Montgomery B., Colavincenzo V. Immunobiology of the feto-maternal interface. *Immunol. Rev.* 1983; 75: 87-116.
- Yuan L., Ward L.A., Rosen B.I., To T.L., Saif L.J. Systematic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J. Virol.* 1996; 70(5): 3075-83.
- Burns J.W., Krishnaney A.A., Vo P.T., Rouse R.V., Anderson L.J., Greenberg H.B. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology*. 1995; 207(1): 143-53. doi: 10.1006/viro.1995.1060
- Ciarlet M., Conner M.E., Finegold M.J., Estes M.K. Group A rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. *J. Virol.* 2002; 76(1): 41-57.
- Wyatt R.G., James W.D., Bohl E.H., Theil K.W., Saif L.J., Kalica A.R., et al. 1980. Human rotavirus type 2: cultivation in vitro. *Science*. 1980; 207(4427): 189-91.
- Bohl E.H., Salt L.J., Theil K.W., Agnes A.G., Cross R.F. Porcine parrotrotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15(2): 312-9.
- WHO. Manual of rotavirus detection and characterization methods. 2009. Available at: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/sentinel/WHO_IVB_08.17_eng.pdf
- Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1984; 10(3-4): 203-9.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.