

Баринский И. Ф., Гребенникова Т. В., Альховский С. В., Кочергин-Никитский К. С., Сергеев О. В.,  
Грибенча С. В., Раев С. А.

## Молекулярно-генетическая характеристика вируса, выделенного от больных острым энцефаломиелитом человека и множественным склерозом

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи»  
Минздрава России, 123098, г. Москва

Изучение антигенной и молекулярно-генетической структуры вируса острого энцефаломиелита человека (ОЭМч) показало высокое сходство гена N данного вируса с гомологичным геном фиксированного вируса бешенства. Результаты анализа нуклеотидной последовательности свидетельствуют о принадлежности вируса ОЭМч к генотипу 1 лиссавирусов. Последовательность гена N вируса ОЭМч наиболее близка к таковым штаммов ERA-CB20-M и RV-97 вируса бешенства. Наличие вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу ОЭМч у 6% доноров крови в США и у 1/3 больных рассеянным склерозом, обследованных А. К. Шубладзе и соавт., указывает на необходимость дальнейших исследований роли вируса ОЭМч в патологии человека.

**Ключевые слова:** вирус острого энцефаломиелита человека; рассеянный склероз; фиксированный вирус бешенства; вируснейтрализующие антитела; филогенетический анализ.

**Для цитирования:** Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 14–18.

*Barinsky I.F., Grebennikova T.V., Alkhovsky S.V., Kochergin-Nikitsky K.S., Sergeyev O. V., Gribench S.V., Raev S.A*

### Molecular genetic characteristics of the virus isolated from patients with human acute encephalomyelitis and multiple sclerosis

The D.I. Ivanovsky Institute of Virology Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya", 123098, Moscow, Russia

The study of the antigenic and molecular genetic structure of human acute encephalomyelitis virus (HAEV) showed a high similarity of the HAEV N gene with the homologous gene of the fixed rabies virus strain. The results of the nucleotide sequence analysis indicate that HAEV belongs to the lyssavirus genotype 1. The N gene sequence is the closest to those of the ERA-CB20-M and RV-97 strains of the rabies virus. The need for further research into the role of the human acute encephalomyelitis virus in human pathology stems from past surveys that revealed the presence of the VNAs against this virus in 6 per cent of the blood received from donors in the USA and in each third among the patients with multiple sclerosis in the former USSR.

**Key words:** human acute encephalomyelitis virus (HAEV); multiple sclerosis; fixed rabies virus; virus neutralizing antibodies (VNAs); phylogenetic analysis.

**Citation:** Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 14–18. (In Russ.)

**For correspondence:** Oleg Sergeev, MD, PhD; e-mail: osergeyev123@gmail.com

Received 29.05.14

### Введение

Штаммы вируса острого энцефаломиелита человека (ОЭМч) были впервые выделены в 1942 г. из крови больных [1]. В дальнейшем идентичные штаммы вируса ОЭМч выделены из спинномозговой жидкости больных множественным склерозом (МС) [1]. Свойства вируса ОЭМч были детально изучены А. К. Шубладзе и соавт. [1]. Вирус ОЭМч отнесен к семейству Rhabdoviridae, определены его сходство с уличным и фиксированным вирусами бешенства и признаки, отличающие его от этих вирусов.

В исследованиях В. Н. Бычковой и соавт. [1] по выделению и изучению 9 штаммов вируса ОЭМч установлено, что этот вирус выделяется из спинномозговой жидкости и крови больных рассеянным склерозом, что практически не доказано для уличного и фиксированного вирусов бешенства. Заболевание у животных, вызванное вирусом ОЭМч, сопровожда-

ется поражением белого вещества мозга (демиелинизация) и развитием хронических форм с ремиссиями и обострениями, проявляющимися парезами и атаксией, и отличается длительностью течения (от 2 до 5 мес у мышей и от 2 до 12 мес у птиц).

Заслуживает специального внимания тот факт, что при признаваемой большинством исследователей полиэтиологической природе МС у 28% больных МС, обследованных авторами, выявлены в высоком титре вируснейтрализующие антитела (ВНА), хотя никто из них не получал прививку против бешенства. Следует также отметить, что у этой 1/3 серопозитивных к вирусу ОЭМч больных МС в стадии обострения В. Н. Бычковой и соавт. выявлена активация специфических реакций клеточного иммунитета к вирусу ОЭМч.

Все это предопределило проведение специальных молекулярно-биологических исследований, посвященных генетической характеристике штаммов ви-

руса ОЭМч в сравнении с уличным и фиксированным вирусами бешенства.

### Материалы и методы

**Вирусные штаммы.** Использовали штамм «Резник» вируса ОЭМч, выделенного А. К. Шубладзе в 1959 г. Вирус получен из государственной коллекции вирусов РФ при ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России в виде лиофилизированной мозговой суспензии. Вирус прошел 29 мозговых пассажей на 6 - 7-граммовых мышках-сосунках. Титр вируса при внутримозговом заражении составлял  $5,5 \lg \text{ЛД}_{50}/0,03 \text{ мл}$ . Этот вирус был использован для инфицирования культуры клеток ВНК-21. Клетки получали из музея культур клеток ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» и выращивали на среде DMEM с добавлением 5% сыворотки эмбриона телят при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . На этой культуре были проведены 2 пассажа. Титр вируса в культуральной жидкости составил  $6 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ . Параллельно на этой культуре проводили 3 серийных пассажа фиксированного вируса бешенства штамма ERA-CB20-M, полученного С. В. Грибенчей и соавт. благодаря новому принципу селекции вируса из популяции штамма ERA [2]. Титр этого штамма вируса составил  $6,33 \text{ТСГО}_{50}/\text{мл}$ . Оба штамма были выделены из 100 мл культуральной жидкости методом ультрацентрифугирования.

Штаммом «Резник» были заражены беспородные белые мыши интрацеребрально в дозе 50 - 100  $\text{ЛД}_{50}$ . На 5 - 7-й день после заражения все мыши заболели паралитическим энцефалитом. Титр вируса в мозге мышей варьировал в пределах  $10^{7,3} - 10^{7,7} \text{ЛД}_{50}$ . Из ткани мозга мышей, заболевших паралитическим энцефалитом, делали срезы, а также отпечатки. После высушивания препараты (отпечатки головного мозга) фиксировали в ацетоне при  $-20^\circ\text{C}$ . На 2-е сутки фиксированные препараты на стеклах окрашивали прямым методом иммунофлюо-

ресценции с использованием моноклональных антител 2e11 [2]. Структуру и размер специфических включений определяли в люминесцентном микроскопе.

**Выделение РНК.** Суспензию очищенного вируса ОЭМч смешивали с равным объемом реагента TRIzol («Life Technology», США). Далее выделяли РНК согласно прилагаемой инструкции производителя. Конечный осадок РНК растворяли в 100 мкл дистиллированной воды, обработанной DEPC. Концентрацию РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit («Invitrogen», США).

**Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование.** Для получения кДНК около 100 нг РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы с гексапраймером при  $85^\circ\text{C}$  в течение 5 мин, после чего помещали в лед. К фрагментированной РНК добавляли 200 ед. фермента RevertAid Premium («Thermo Scientific», США) и 20 ед. ингибитора РНКаз RNAsine («Promega», США), инкубировали при  $25^\circ\text{C}$  10 мин, далее при  $42^\circ\text{C}$  в течение 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при  $70^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Синтез второй цепи кДНК проводили с помощью набора NEBNext mRNA Second Strand Synthesis Module («NEB», США) в соответствии с инструкцией. Полученную дцДНК очищали, используя набор MinElute PCR Purification Kit («QIAGEN», Германия), на автоматической станции QIAcube.

Для получения ДНК-библиотек из дцДНК использовали набор TruSeq DNA Sample Prep Kits v2 («Illumina», США) в соответствии с инструкцией. Для селекции ДНК по размеру применяли реагент Ampure XP («Beckman Coulter», США) с расчетом получения ДНК-библиотек длиной более 270 нуклеотидных оснований (н. о.), что соответствует размеру вставки около 150 н. о. Данные требования к размеру ДНК-библиотек связаны с использованием для секвенирования набора, позволяющего секвенировать не более

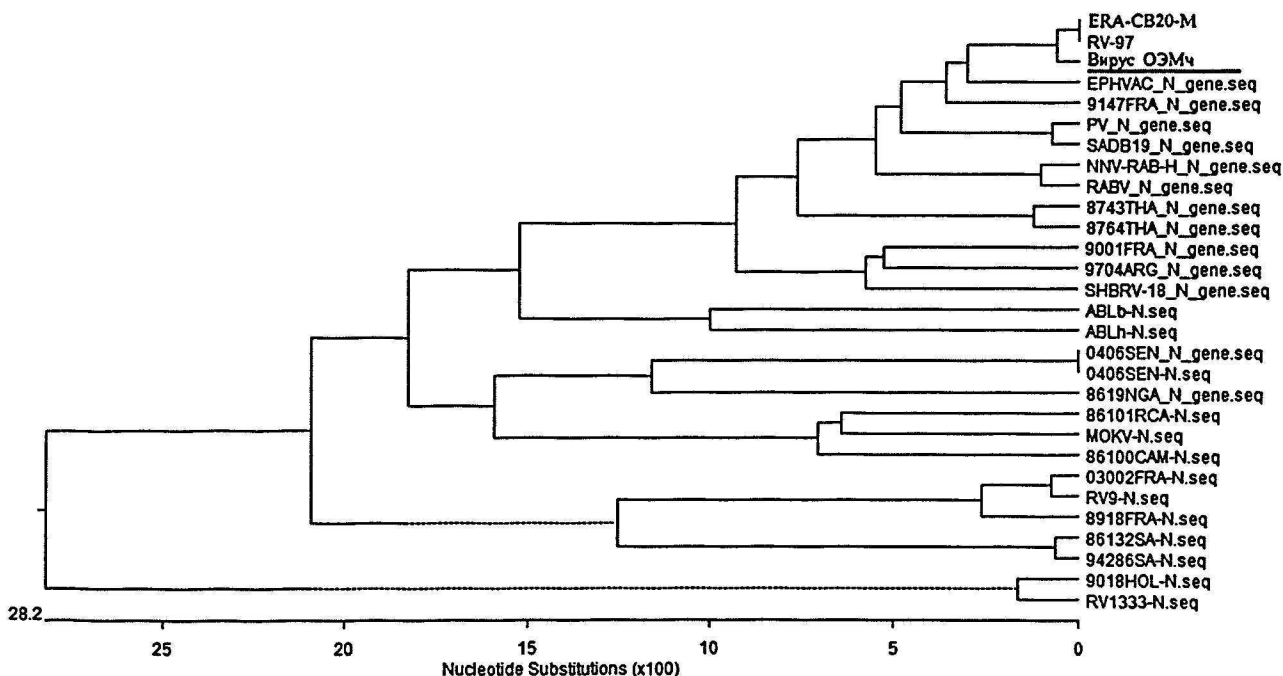


Рис. 1. Первичная структура гена N лиссавирусов и вируса ОЭМч.

Первичная структура генома вирусов бешенства штамма ERA-CB20-M и ОЭМч штамма «Резник»

Штамм	Позиция (нумерация от ATG гена N)					
	51	135	171	186	255	369
ERA-CB20-M	A	A	A	T	T	A
«Резник»	G	G	G	C	G	G
Аминокислотная замена	-	-	-	-	C→W	-

150 н. о. в одну сторону. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза QIAxcel Advanced System («QIAGEN», Германия). Молярность полученных библиотек измеряли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix («BioRad», США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве Sequencing Library qPCR Quantification Guide («Illumina», США).

Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq («Illumina», США), используя набор MiSeq Reagent Kits v2 (300PE) в соответствии с инструкцией производителя.

**Биоинформационный анализ.** Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов проводили с помощью программы CLC Genomics Workbench 6.0 («CLC Bio», США). Предварительный поиск гомологичных последовательностей осуществляли, используя сервис BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали пакет программ Lasergene Core Suite («DNAs-tar», США). Последовательности сравнивали методом множественного выравнивания по алгоритму ClustalW. Филогенетический анализ и построение дендрограмм проводили с использованием программы MegaAlign версии 6.06 по методу ближнего соседа или максимального правдоподобия (maximum likelihood) с 100-кратным бутстрэп-тестированием.

### Результаты и обсуждение

На основании данных морфологии вириона вирус ОЭМч был отнесен к семейству Rhabdoviridae [1]. В данном исследовании были использованы наиболее релевантные методы классификации данного вируса, изучения его антигенной природы и филогенетического анализа генома.

Установлено, что специфичность моноклональных антител 2e11 в равной мере распространяется на оба использованных в работе вируса - ОЭМч (штамм «Резник») и бешенства ERA-CB20-M. Как известно, меченые ФИТЦ моноклональные антитела 2e11 связываются в непрямом и прямом иммунофлуоресцентном тесте с N-белком вирусов семейства Rhabdoviridae [2].

В наших дальнейших исследованиях анализировали первичную структуру гена N двух вирусов, вируса ОЭМч штамма «Резник» и фиксированного вируса бешенства штамма ERA-CB20-M (рис. 1). Затем проводили сравнение полного генома обоих вирусов и анализировали филогенетические отношения.

Определяли первичную структуру фрагмента гена N вируса ОЭМч, кодирующего нуклеокапсидный белок вириона. Полученные данные о нуклеотидной последовательности фрагмента гена N вируса ОЭМч сравнивали с данными гомологичной последовательности фиксированного вируса бешенства, а также

других штаммов вируса бешенства, взятых из работы О. Delmas и соавт. [4].

На рис. 1 представлена филогенетическая дендрограмма, построенная на основании последовательностей гена N вируса ОЭМч штамма «Резник» и фиксированного вируса бешенства штамма ERA-CB20-M. Показана наибольшая гомология гена N этих двух вирусов. В гене N вируса ОЭМч штамма «Резник» обнаружены 6 замен по сравнению с гомологичным фрагментом гена N штамма ERA-CB20-M вируса бешенства, все замены являются однонуклеотидными и одна из них приводит к аминокислотной замене (см. таблицу). Вместе с рядом других штаммов вируса бешенства они образуют генотип 1. Различия внутри генотипа 1 составляют не более 5%, от других генотипов он отличается на 15–20% (см. рис. 1). Для сравнения приведена внешняя группа, включающая изоляты RV1333 и 9018HOL, которая отличается от других генотипов более чем на 25%.

Анализ дендрограммы, представленной на рис. 2, показывает, что геном вируса ОЭМч штамма «Резник» имеет наибольшую гомологию с геномом фиксированного (вакцинного) вируса бешенства штамма RV-97 (98%), также относящегося к генотипу 1 вирусов семейства Rhabdoviridae.

МС является в настоящее время распространенным заболеванием в странах умеренного климата и регистрируется в 4,7 - 6,8% случаев среди всех органических поражений нервной системы. Вирусная этиология заболевания предполагается на основании результатов целой серии вирусологических исследований, в ходе которых были выделены вирусы семейств Herpesviridae, Rhabdoviridae, Paramyxoviridae и группы арбовирусов.

Относительно инapparантного течения рабической инфекции у человека данных очень мало [3]. При обследовании здоровых лиц в США ВНА к фиксированному вирусу бешенства обнаружены в низких титрах в 6% случаев у доноров, никогда не подвергавшихся вакцинации против бешенства [1].

Выпускаявшаяся на харьковском заводе биопрепаратов МЗ СССР инактивированная формалином мозговая крысиная вакцина из вируса ОЭМч (штамм «Резник») с успехом использовалась при внутримышечном введении как лечебная вакцина для профилактики рецидивов заболевания. Вакцина оказывала лечебное действие только у 1/3 больных рассеянным склерозом, у которых были обнаружены ВНА к вирусу ОЭМч и внутрикожная проба с вакциной давала положительный результат. Среди 56 лиц, страдающих другими заболеваниями ЦНС, положительная кожная проба наблюдалась лишь у 1 больного.

Таким образом, проведенное изучение молекулярно-генетической структуры вируса ОЭМч показало высокое сходство генома данного вируса с геномом фиксированного вируса бешенства штаммов ERA-CB20-M и RV-97. Результаты анализа последовательности с использованием программного обеспечения BLASTX свидетельствуют о его принадлежности к генотипу 1 лиссавирусов. Последовательность генома вируса ОЭМч штамма «Резник» наиболее близка к последовательности вируса бешенства штамма RV-97. Наличие ВНА у 6% доноров крови в США и у 1/3 больных рассеянным склерозом, обследованных А. К. Шубладзе и соавт. [1], указывает на необходимость дальнейших исследований роли вируса ОЭМч в патологии человека.

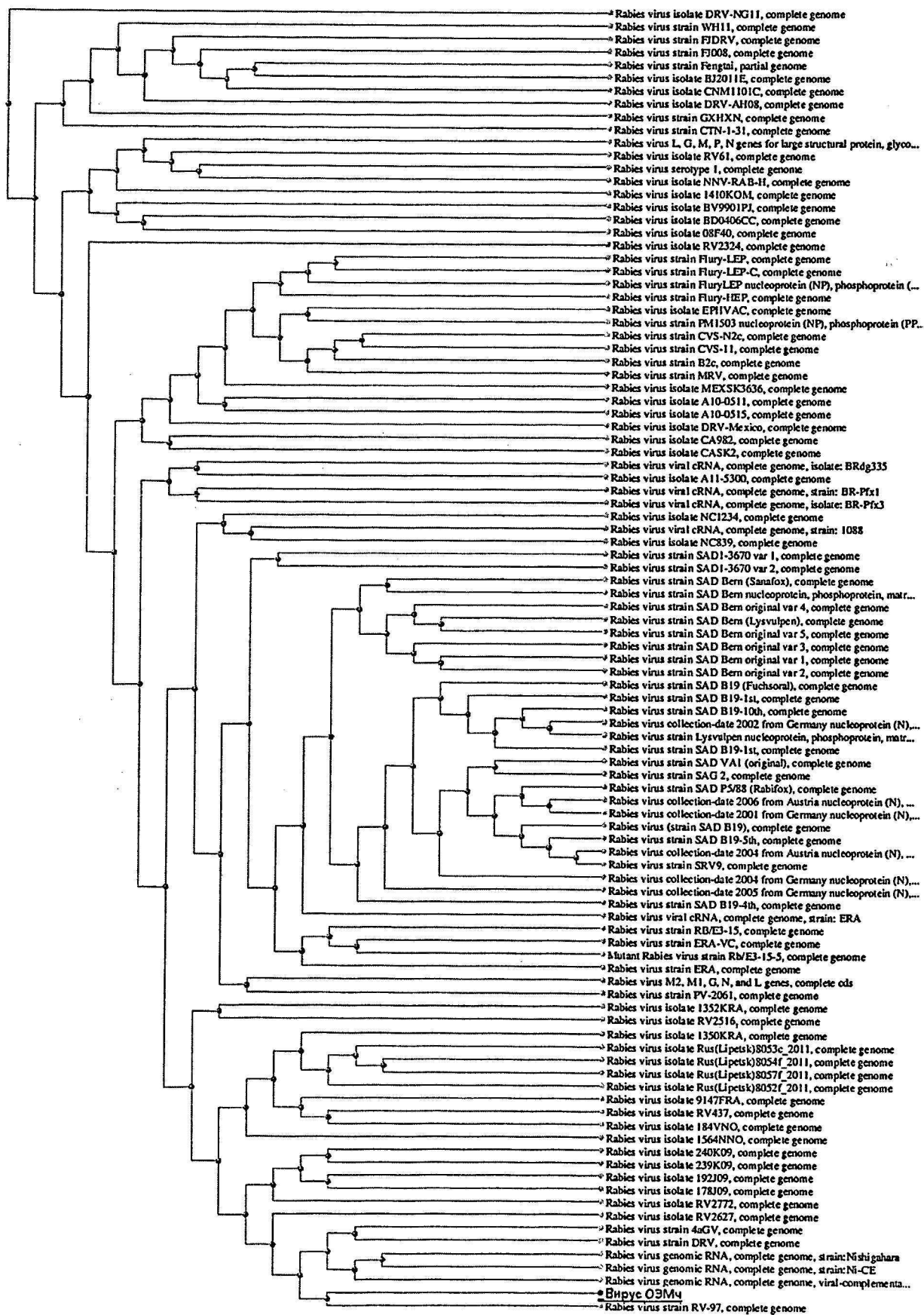


Рис. 2. Первичная структура полного генома лиссавирусов и вируса ОЭМч.

1. Баринский И.Ф., Шубладзе А.К. *Этиология хронических вирусных нейроинфекций*. М.: Медицина; 1984.
2. Гривенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибезов В.В. и др. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(5): 38–43.
3. Гривенча С.В., Львов Д.К. Бешенство. В кн.: Львов Д.К., ред. *Вирусы и вирусные заболевания человека и животных*. М.: Медицина; 2013: 811.
4. Delmas O., Holmes E.C., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., Bouchier C., Bourhy H. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One*. 2008; 3(4): e2057.

1. Barinskiy I.F., Shubladsze A.K. *Etiology of the Chronic Neuroinfections [Etiologiya Khronicheskikh Virusnykh Neyroinfektsiy]*. Moscow: Meditsina; 1984. (in Russian).
2. Gribencha S.V., Kozlov A.Yu., Kostina L.V., Elakov A.L., Losich M.A., Tsibezov V.V. et al. Obtaining of monoclonal antibodies against the rabies virus nucleoprotein. *Voprosy Virusologii*. 2013; 58(5): 38–43. (in Russian).
3. Gribencha S.V., L'vov D.K. Rabies. In: L'vov D.K., ed. *Viruses and Viral Diseases of Humans and Animals [Virusy i Virusnye Zabolevaniya Cheloveka i Zhivotnykh]*. Moscow: Meditsina; 2013: 811. (in Russian).
4. Delmas O., Holmes E.C., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., Bouchier C., Bourhy H. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One*. 2008; 3(4): e2057.

Поступила 29.05.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.371:579.841.931.012.6:578.832.1.083

Садикалиева С. О.<sup>1</sup>, Султанкулова К. Т.<sup>1</sup>, Шораяева К. А.<sup>1</sup>, Строчков В. М.<sup>1</sup>, Червякова О. В.<sup>1</sup>, Зайцев В. Л.<sup>1</sup>, Табынов К. К.<sup>1</sup>, Сандыбаев Н. Т.<sup>1</sup>, Сансызбай А. Р.<sup>1</sup>, Егоров А. Ю.<sup>2</sup>

## Генетическая стабильность HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующего бруцеллезный ген

<sup>1</sup>НИИ проблем биологической безопасности, 080409, пос. Гвардейский, Казахстан; <sup>2</sup>HSC Development GmbH, Тульн, Австрия

Сконструирован рекомбинантный штамм вируса гриппа Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующий бруцеллезный ген *Omp16*, на основе технологии обратной генетики для создания векторной противобруцеллезной вакцины. Полученный рекомбинантный штамм является генетически стабильным. Стабильность подтверждена сравнительным анализом нуклеотидных последовательностей HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующего ген *Omp16* (GenBank: AAA59360.1) *Brucella abortus*. Сравнительный генетический анализ показал, что нуклеотидная последовательность гена NS 1-го и 5-го пассажных уровней вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) на 100% соответствует исходному участку 12AAS2TC\_124omp16g, содержащему химерный NS1-124-Omp16 в составе ДНК-плазмиды pHW2000. В результате сравнительного генетического анализа установлена 100% идентичность нуклеотидных последовательностей HA- и NA-генов 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с генами HA и NA штамма A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1). Было показано, что рекомбинантный векторный вирус Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующий бруцеллезный ген *Omp16*, сохраняет генетическую стабильность на протяжении 5 пассажей на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (ПКЭ).

**Ключевые слова:** рекомбинантный векторный вирус; бруцеллезный ген; гемагглютинин; нейраминидаза; неструктурный белок; полимеразная цепная реакция; генетический анализ.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 18–23.

Sadikaliyeva S.O., Sultankulova K.T., Shorayeva K.A., Strochkov V.M., Chervyakova O.V., Zaitsev V.L., Tabynov K.K., Sandybayev N.T., Sansyzbay A.R., Egorov A.Yu.

### Genetic stability of the HA, NA, and NS genes of the recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the brucellar gene

<sup>1</sup>Scientific-Research Institute of Biological Safety Problems, 080409, Gvardeiskiy, Kazakhstan; <sup>2</sup>HSC Development GmbH, Tulln, Austria

The recombinant strain Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) of the influenza virus expressing the brucellar *Omp16* gene was constructed on the basis of the technology of reverse genetics for the purpose of developing vector anti-brucellosis vaccine. The obtained recombinant strain is a genetically stable construction. This stability is confirmed by the comparative analysis of the nucleotide sequences of the HA, NA, and NS genes of the recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the *Omp16* gene of the *Brucella abortus* (GenBank: AAA59360.1). The comparative analysis showed that the nucleotide sequence of the NS gene of the first and the fifth passage level of the Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) virus corresponded for 100% to the initial part of 12AAS2TC\_124 Omp16g containing the chimera NS1-124-Omp16 in the composition of DNA (deoxyribonucleic acid) plasmids pHW2000. Total identity with HA and NA genes of the strain A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) was shown by the comparative analysis of the nucleotide sequences of HA and NA genes of the first and the fifth passage level of the recombinant strain Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1). The recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the brucella *Omp16* gene maintains the genetic stability during 5 passages in 10-day developing chicken embryos.

**Key words:** recombinant vector virus; brucellosis gene; hemagglutinin; neuraminidase; non-structural protein; PCR (polymerase chain reaction); genetic analysis.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 18–23. (In Russ.)

For correspondence: Sandugash Sadikaliyeva, Junior research fellow; e-mail: t.m.tlenchieva@mail.ru

Received 11.03.14

Для корреспонденции: Садикалиева Сандугаш Оразбековна, мл. науч. сотр.; e-mail: t.m.tlenchieva@mail.ru