
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Латышев О.Е.¹, Елисеева О.В.¹, Костина Л.В.¹, Алексеев К.П.¹, Хаметова К.М.¹,
Алтаева Е.Г.², Верховский О.А.², Алипер Т.И.¹, Гребенникова Т.В.^{1,3}

ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ КЛОНИРОВАННОГО ШТАММА WA РОТАВИРУСА А ЧЕЛОВЕКА

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

²АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва, Россия;

³Российский университет дружбы народов, 117198, Москва, Россия

Введение. Ротавирусная инфекция (РВИ), этиологическим агентом которой является дцРНК-содержащий вирус рода *Rotavirus* семейства *Reoviridae*, относящийся к группе А (РВА), служит причиной тяжёлых диарей у человека и различных видов млекопитающих. Вакцинопрофилактика – наиболее эффективный способ снижения уровня заболеваемости РВИ. В настоящее время экспериментально доказана эффективность использования поросят-гнотобиотов в качестве универсальной модели для воспроизведения РВИ человека и оценки качества вакцинных препаратов против РВИ.

Цели и задачи. Оценка иммуногенной активности клонированного штамма Wa РВА в опыте на новорождённых поросятах вьетнамской вислобрюхой породы.

Материал и методы. Получение клонированного штамма Wa РВА человека, rVP6 РВА человека. Иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией для выявления РВА человека. Иммунизация и экспериментальное заражение новорождённых поросят.

Результаты. В статье представлены результаты опыта по двукратной иммунизации новорождённых поросят препаратами нативного вируса с инфекционной активностью 5,5 lg ТЦИД₅₀/мл в дозе 3 см³, HRV с адьювантом в дозе 500 мкг и плацебо (контроль) с последующим экспериментальным заражением всех животных вирусом вирулентного штамма Wa G1P[8] РВА человека с инфекционной активностью 5,5 lg ТЦИД₅₀/мл в дозе 5 см³. Клинические признаки болезни и гибель наблюдали только у контрольных животных. Разработан метод детекции РНК РВА с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в ректальных смывах, пробах тонкого отдела кишечника и периферических лимфатических узлах. На основе полученного rVP6 РВА человека разработан метод выявления специфических IgG-антител к РВА с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), и приведены результаты выявления РВА в сыворотке крови подопытных поросят.

Заключение. В ходе проведённых исследований установлена высокая иммуногенная активность нативного и очищенного вируса клонированного штамма Wa РВА и подтверждена возможность его применения в качестве основного компонента вакцины против РВИ. Показана возможность использования конвенционных новорождённых поросят вместо поросят-гнотобиотов в качестве опытной модели.

Ключевые слова: ротавирус А; рекомбинантный белок VP6; иммунизация; заражение; ОТ-ПЦР; иммуноферментный анализ; новорожденные поросята.

Для цитирования: Латышев О.Е., Елисеева О.В., Костина Л.В., Алексеев К.П., Хаметова К.М., Алтаева Е.Г., Верховский О.А., Алипер Т.И., Гребенникова Т.В. Оценка иммуногенной активности клонированного штамма WA ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4): 156-164.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164>

Информация об авторах:

Латышев О.Е., <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Елисеева О.В., <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Костина Л.В., <https://orcid.org/0000-0002-9556-1454>

Алексеев К.П., <https://orcid.org/0000-0001-9536-3127>

Хаметова К.М., <https://orcid.org/0000-0002-8461-600X>

Алтаева Е.Г., <https://orcid.org/0000-0001-7188-1704>

Верховский О.А., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

Алипер Т.И., <https://orcid.org/0000-0002-5876-2425>

Гребенникова Т.В., <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Для корреспонденции: Латышев Олег Евгеньевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: oleglat80@mail.ru

Latyshev O.E.¹, Eliseeva O.V.¹, Kostina L.V.¹, Alekseev K.P.¹, Khametova K.M.¹, Altaeva E.G.², Verkhovskiy O.A.², Aliper T.I.¹, Grebennikova T.V.^{1,3}

ASSESSMENT OF IMMUNOGENIC ACTIVITY OF THE CLONED HUMAN ROTAVIRUS A WA STRAIN

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

²Diagnostics and Prevention Research Institute for Human and Animal Diseases, Moscow, 123098, Russian Federation;

³Peoples Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russian Federation

Introduction. Rotavirus infection (RVI) caused by the dsRNA-containing virus from genus Rotavirus, Reoviridae family, belonging to group A (RVA), is the cause of severe diarrhea in human and other mammalian species. Vaccination is the most effective way to reduce the incidence of RVI. At present, the effectiveness of using gnotobiotic piglets as a universal model for reproducing human rotavirus infection and assessing the quality of RVI vaccine preparations has been experimentally proven.

Goals and objectives. Evaluation of immunogenic activity of the cloned RVA Wa strain in the new-born Vietnamese pot-bellied piglets trial.

Material and methods. Development of viral preparations of the cloned human Wa strain PBA, development of human RVA rVP6, ELISA, polymerase chain reaction with reverse transcription, immunization and experimental infection of newborn piglets.

Results. The article presents the results of the experiment on double immunization of newborn piglets with native virus preparations with the infection activity 5.5 lg TCID₅₀/ml, 3 cm³ per dose, HRV with adjuvant 500 µg per dose and mock preparation (control group) followed with experimental inoculation of all animals with virulent virus strain Wa G1P[8] human RVA with infectious activity of 5.5 lg TCID₅₀/ml in 5 cm³ dose. Development of clinical signs of disease and animal death were observed only in control group. RT-PCR system to detect RVA RNA in rectal swabs, samples of small intestine and peripheral lymph nodes was developed. ELISA based on obtained human RVA rVP6 was developed and results on RVA-specific IgG-antibodies in serum samples of experimental piglets are presented.

Conclusion. In the course of the research, a high immunogenic activity of the native and purified virus of the cloned Wa RVA strain Wa was established and the possibility of its use as the main component of the RVI vaccine was confirmed. The possibility of using conventional newborn pigs instead of gnotobiotic piglets as an experimental model was demonstrated.

Keywords: rotavirus A; recombinant VP6 protein; immunization; infection; RT-PCR; ELISA; newborn piglets.

For citation: Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Kostina L.V., Alekseev K.P., Khametova K.M., Altaeva E.G., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I., Grebennikova T.V. Assessment of immunogenic activity of the cloned human rotavirus A WA strain. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4): 156-164. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164>

For correspondence: Oleg E. Latyshev, PhD, Senior Scientist, Laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: oleglat80@mail.ru

Information about authors:

Latyshev O.E., <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Eliseeva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

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

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

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

Altaeva E.G., <https://orcid.org/0000-0001-7188-1704>

Verkhovskiy O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

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

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

Acknowledgments. The publication was prepared with the support of the RUDN «5-100».

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

Received 19 August 2019

Accepted 10 October 2019

Введение

Ротавирусная инфекция (РВИ), этиологическим агентом которой является дцРНК-содержащий вирус рода *Rotavirus* семейства *Reoviridae*, относящийся к группе А (РВА), вызывает болезнь у человека и различных видов млекопитающих. Заболевание характеризуется острым течением, диареей, рвотой, гастроэнтеритом и развитием общего интоксикационного синдрома. РВА имеет основное значение в заболеваемости детей, госпитализированных с синдромом гастроэнтерита [1], и является основным этиологическим фактором повсеместно распространённых и зачастую летальных острых кишечных инфекций. РВА

реплицируются преимущественно в эпителиальных клетках ворсинок тонкого отдела кишечника, вызывая их дегенерацию, некроз и десквамацию [2]. Структурная особенность трёхслойной белковой оболочки вирусных частиц ротавирусов делает их устойчивыми к кислой среде желудка и пищеварительным ферментам кишечника, поэтому РВА является важнейшим энтеропатогеном неонатального периода человека и многих видов животных, включая свиней.

На основе антигенных особенностей белка VP4 и структуры гена VP7 штаммы РВА подразделяют по VP7 на G-типы, а по VP4 – на P-типы. На сегодняшний день известно 32 G-генотипа и 47 P-генотипов РВА,

при этом наиболее распространены в мире 6 G-типов (G1, G2, G3, G4, G9 и G12) и 3 P-типа (P[4], P[6] и P[8]) [3–5]. Эпидемиологическую значимость у человека имеют штаммы РВА, относящиеся к генотипами G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [6–8]. Кроме того, у людей отмечено глобальное распространение новых, не циркулировавших ранее генотипов РВА, вероятно, животного происхождения, что свидетельствует о межвидовой ресторации вируса [9, 10].

Вакцинопрофилактика является наиболее эффективным способом снижения уровня заболеваемости РВИ и в настоящее время вакцинация против РВИ включена в национальные календари прививок 82 стран мира [11]. На мировом рынке доступны две вакцины, основанные на живых ослабленных штаммах РВА человеческого и/или животного происхождения: моновалентная Rotarix и пентавалентная RotaTeq [12]. Моновалентная аттенуированная вакцина (РВ1) Rotarix (GSK Biologicals, Бельгия) создана на основе ослабленного штамма РВ G1P[8], который является эпидемическим актуальным штаммом в США и во многих других странах. Пятивалентная живая оральная вакцина (РВ5) RotaTeq (Merck and Co., США) содержит 5 реассортантных вирусов, полученных на основе бычьего и человеческих штаммов РВА [13]. Клинические испытания вакцин показали, что эффект вакцинации по предотвращению всех случаев РВИ примерно одинаков. Эффективность РВ1 против тяжёлого ротавирусного гастроэнтерита составила 84, 75 и 57% в странах с низким, средним и высоким уровнем детской смертности соответственно, для РВ5 – 72–96% против всех случаев тяжёлой диареи у детей младшего возраста. В странах с высокой смертностью РВ5 предотвращала 41–57% случаев РВИ [14].

Поскольку к заражению РВА восприимчив не только человек, но и различные виды млекопитающих, то ряд зарубежных исследователей воспроизвели РВИ человека на поросятах-гнотобиотах и экспериментально доказали их эффективность в качестве универсальной модели для оценки качества вакцинных препаратов против РВИ человека [15–18]. Это обусловлено значительным сходством в физиологическом развитии, анатомических аспектах и механизмах формирования системного и местного иммунитета младенцев и новорождённых поросят [19–21]. Благодаря аутбридингу поросята позволяют имитировать разнообразие человеческой популяции, они, как и младенцы, иммунокомпетентны в момент рождения, но иммунологически незрелые [22]. Моделирование инфекции и/или вакцинации на поросятах-гнотобиотах, получивших или не получивших молозиво, т.е. с циркулирующими в кровотоке и присутствующими в кишечнике антителами или же без них, позволяет имитировать сценарии вакцинации детей, получающих смеси либо находящихся на грудном вскармливании [23].

Ранее нами проведены исследования молекулярно-биологических свойств клонированного штамма ротавируса человека Wa РВА, который идентичен актуальному эпидемическому штамму Wa G1P[8] РВА, и

обладает большим потенциалом для дальнейшего использования в качестве вакцинного препарата [15].

Цель настоящей работы – оценка иммуногенной активности клонированного штамма Wa РВА в опыте на новорождённых поросятах и изучение возможности использования конвенционных животных для этой цели.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали клонированный штамм Wa РВА и вирулентный штамм Wa G1P[8] РВА человека, адаптированные к культуре клеток MARC-145 [15]. Вирусы культивировали на среде DMEM, для получения очищенного препарата использовали вирус штамма Wa РВА, концентрированный полиэтиленгликолем и очищенный в градиенте плотности сахарозы (HRV). Концентрацию белка в HRV определяли с помощью набора micro-BSA («Biorad», США), степень его очистки и структурный состав вирусных белков – методом электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН-ПААГ), как описано нами ранее [15]. Для экспериментального заражения новорождённых поросят использовали вирулентный штамм Wa G1P[8] РВА человека с инфекционной активностью 5,50 lg ТЦД₅₀/мл.

Рекомбинантный белок rVP6 РВА человека. Синтетический ген, кодирующий кодон-оптимизированную последовательность гена VP6 актуального эпидемического изолята РВА человека RVA/Human-wt/GR/Ath146/2010/G4P[8] (KC890881 в базе данных GenBank), был изготовлен по нашему заказу (ЗАО «Евроген», Россия) и клонирован в трансферную плазмиду для бакуловирусной системы экспрессии pFastBacDual из набора Bac-to-Bac (Invitrogen, США). Рекомбинантный бакуловirus был получен согласно рекомендациям производителя системы экспрессии Bac-to-Bac (Invitrogen, США) и использован для трансфекции клеток насекомых SF-9. Клетки выращивали в культуральных пластиковых флаконах (матрасах) различного объёма, а также в условиях суспензии (10–20 об/мин) с использованием бессывороточных сред EX-Cell 420 (SAFC, Германия) при 27°C. Для роллерного метода культивирования посевная концентрация клеток составляла $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Для получения препарата белка для использования в ИФА осадок клеток замораживали-оттаивали, ресуспендировали в 10-кратном объёме карбонат-бикарбонатного буфера pH 9,6 и обрабатывали ультразвуком с помощью погружного зонда 5 мм в течение 2 мин на максимальной мощности с интервалом в 1 с. Полученную суспензию осветляли центрифугированием 5 мин на настольной центрифуге 5415D (Eppendorf, Германия) на максимальных оборотах, осветлённый лизат использовали для сорбции иммунологических планшетов.

Имуноферментный анализ. Для выявления антигенов к РВА в сыворотке крови свиней был разработан непрямой вариант ИФА с HRV и rVP6 РВА в качестве антигенов и сывороток крови, полученных от серопозитивных и серонегативных животных. При постановке ИФА антигены сорбировали на иммунологических

микропланшетах (Greiner Bio-One, Германия) в 0,1 М КББ (карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 9,5) в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Свободные участки пластика блокировали, внося в каждую лунку по 200 мкл раствора инертного белка. На следующих этапах в лунки микропланшета последовательно вносили испытуемые пробы (положительные и отрицательные сыворотки крови свиней и поросят в последовательных разведениях начиная с 1 : 200) и моноклональные антитела к IgG свиньи, меченные пероксидазой хрена (конъюгат) в рабочем разведении. В качестве промывочного раствора использовали фосфатно-солевой буфер с Твин-20 (ФСБТ) (0,01 М фосфатный буфер, 170 mM NaCl, 0,1% твин-20, pH 7,4). Все этапы реакции сопровождалась инкубацией планшетов с каждым из реагентов в течение 1 ч при 37 °С. В качестве хромоген-субстратной смеси использовали однокомпонентный субстратный буфер, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и H₂O₂ (ООО «Хема-Медика», Россия). Реакцию останавливали через 15 мин добавлением в лунки 50 мкл 1 М H₂SO₄. Результаты реакции регистрировали на спектрофотометре с вертикальным лучом света (iMark Microplate Reader, «Bio-Rad», Япония) при длине волны 450 нм по коэффициенту оптического поглощения (ОП 450). Параллельно все испытуемые пробы исследовали на наличие антител к РВА в коммерческом наборе «Ngezim Rotavirus Porcino» («Ingenasa», Испания) по методике производителя.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Наличие РНК РВА человека определяли методом ОТ-ПЦР с использованием пар специфичных праймеров на участки генов [24, 25]:

- VP4: RotaVP4Con3: TGGCTTCGCTCATTTATA-GACA, RotaVP4Con2: ATTTCCGACCATTTATAACC;
- VP6: RotaVP6-F: GACGGVGCRACTACATGGT, RotaVP6-R: GTCCAATTCATNCCTGGTGG);
- VP7: RotaVP7-F: ATGTATGGTATTGAATATAC-SAC, RotaVP7-R: AACYTGCCACCATTTTTTCC).

Программа амплификации: 50 °С – 30 мин, 95 °С – 5 мин; затем 35 циклов: (94 °С – 15 с, 47 °С (VP7) – 51 °С (VP4) – 52 °С (VP6) – 30 с, 72 °С – 30 с), 72 °С – 10 мин. Для проведения реакции 5 мкл РНК вносили в ПЦР-смесь, состоящую из 5 мкл 5xRT буфера (Fermentas), 1 мкл 10 пмоль каждого праймера, 2,5 мкл смеси dNTP, 0,125 мкл ревертазы RevertAid и 0,25 мкл Taq-полимеразы. Конечный объем смеси – 25 мкл.

Анализ продуктов амплификации выполняли посредством разделения фрагментов ДНК в 1% агарозном геле в TBE буфере. Продукты амплификации в геле окрашивали бромистым этидием. Для определения длины образовавшихся продуктов использовали 100+bp DNA Ladder («Evrogen», Россия).

Животные. В опыте использовали новорождённых поросят породы вьетнамская вислобрюхая. Животных содержали в отдельном помещении в деревянном вольере, оборудованном приспособлениями для корма и воды. До экспериментального заражения поросят содержали вместе со свиноматкой, после заражения

– отдельно по группам. До начала эксперимента сыворотки крови, молозиво и фекалии, полученные от трёх свиноматок и сыворотку крови от 20 новорождённых поросят исследовали на наличие антител к РВА методом ИФА и РНК вируса методом ОТ-ПЦР. Для формирования экспериментальных групп были отобраны 8 серонегативных и отрицательных в ОТ-ПЦР поросят 5-суточного возраста.

Схема эксперимента. Для опыта были сформированы две опытные группы ($n=3$ в каждой) и одна контрольная группа ($n=2$) поросят. Всех животных иммунизировали двукратно, на 0-е и 16-е сутки после начала эксперимента (п.э.). Поросьятам 1-й опытной группы перорально вводили аттенуированный штамм Wa РВА человека с инфекционной активностью 5,50 log ТЦД₅₀/мл в дозе 3 см³. Животных 2-й опытной группы иммунизировали внутримышечно HRV, смешанным с адьювантом (синтетический полимер, pH 7,2–7,4) в соотношении 9:1, в дозе 500 мкг/животное. Поросьятам контрольной группы перорально вводили по 3 см³ среды ДМЕМ, не содержащей РВА (плацебо). На 31-е сутки п.э. проводили экспериментальное заражение всех поросят вирулентным вирусом штамма Wa G1P[8] РВА человека с инфекционной активностью 5,50 Ig ТЦД₅₀/мл в дозе 5 см³/голову, вводя её перорально. В течение эксперимента проводили ежедневный клинический осмотр животных, оценивая активность сосания материнского молока, поведенческие реакции, состояние кожных и слизистых покровов. Регистрировали наличие выделений из ротовой и носовой полостей, консистенцию кала. Измеряли массу тела, ректальную температуру, брали кровь и ректальные смывы у каждого поросёнка на 1, 3, 16, 31, 32, 35, 39 и 43-е сутки п.э. Полученные пробы сывороток крови исследовали разработанным и коммерческим ИФА, ректальные смывы – методом ПЦР. Эвтаназию поросят опытных групп осуществляли на 43-и сутки п.э. в соответствии с рекомендациями Европейской комиссии по эвтаназии экспериментальных животных [26], патоморфологическое обследование проводили с описанием состояния внутренних органов и тканей.

Статистическую обработку результатов осуществляли общепринятыми методами с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel 2003, Stat Plus 2005.

Результаты

На первом этапе работы с использованием двух полученных и иммунохимически охарактеризованных антигенов был разработан метод непрямого твердофазного ИФА для выявления антител к РВА в сыворотке крови и молозиве свиней. При исследовании сывороток крови свиней и поросят, полученных от заведомо негативных (клинически здоровые свиньи и рождённые от них поросята из благополучного по РВИ хозяйства, $n=58$) или заведомо РВА-позитивных (вакцинированные животные, $n=36$) свиней, результаты разработанного и коммерческого ИФА совпали в 100% случаев. В первом случае все результаты исследований были

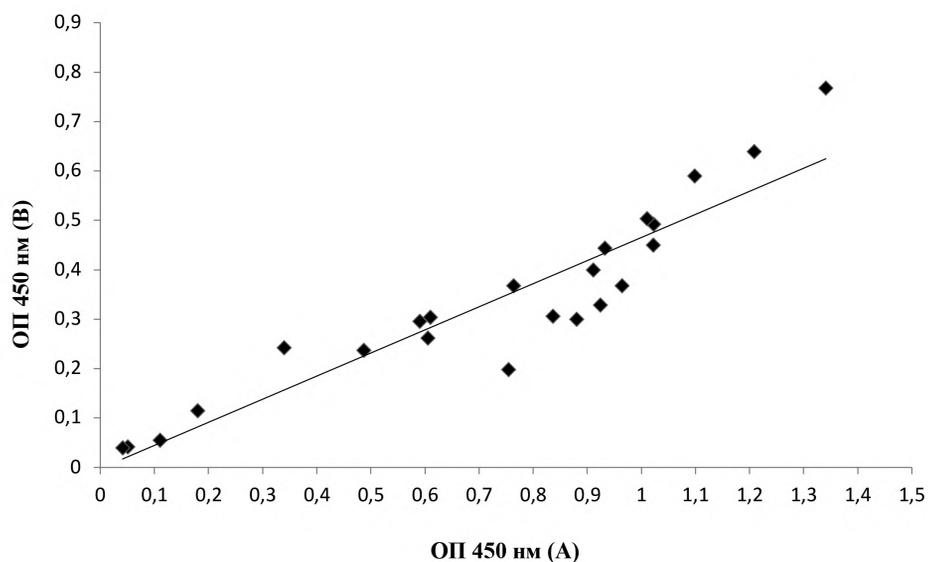


Рис. 1. Сравнительный анализ результатов по определению коррелятивной связи между результатами ИФА, полученными с помощью gVP6 (А) и HRV (Б) при исследовании 23 проб сыворотки крови свиней, полученных из двух свиноводческих хозяйств РФ; данные приведены относительно линии тренда.

отрицательными, во втором – положительными. Установлена положительная корреляция результатов полученных при исследовании отрицательных ($r = 0,98$, $p < 0,05$), положительных ($r = 0,91$, $p < 0,05$) и слабоположительных ($r = 0,79$, $p < 0,05$) проб. Результаты исследований показали, что по сравнению с очищенным вирусом рекомбинантный белок gVP6 наиболее эффективен при использовании в качестве антигена (рис. 1). Он обеспечивал максимальную константу связывания с РВА-специфическими антителами и не снижал антигенную активность при хранении.

Таким образом, разработанный метод ИФА показал высокую чувствительность и специфичность и был использован для серологического обследования трёх супоросных свиноматок непосредственно перед опоросом с целью последующего формирования опытных и контрольной групп новорождённых поросят (рис. 2).

Как показано на рис. 2, у двух свиноматок были выявлены антитела к РВА в титрах 1 : 400 – 1 : 800 (№ 3 и 4 соответственно), только одна свиноматка (№ 5) оказалась РВА-серонегативной. После опороса вирусспецифические антитела были обнаружены в молозиве первых двух животных и не выявлены в молозиве третьей. Результаты ОТ-ПЦР по выявлению РНК вируса в крови и ректальных смывах у этой свиноматки были также отрицательны. Сыворотка крови поросят, рождённых от иммунных свиноматок, содержала антитела к РВА, а поросята от свиноматки № 5 были серонегативными.

Проведённая с интервалом в 16 сут двукратная иммунизация поросят опытных групп не повлияла на их физиологический статус, они, как и поросята контрольной группы, были подвижны, активно сосали материнское молоко, кал был оформленный. Темпера-

тура тела не превышала 39,5 °С, состояние кожных и слизистых покровов оставалось в норме. Выделений из ротовой и носовой полостей не наблюдалось. Равномерный прирост массы тела поросят проходил во всех трёх группах животных до проведения экспериментального заражения (31-е сутки п.э) включительно (рис. 3).

Начиная с 35-х суток п.э (4-е сутки после экспериментального заражения) у поросят контрольной группы регистрировали угнетение, потерю аппетита, снижение массы (см. рис. 2) и температуры тела. Наблюдался жидкий стул серо-зелёного цвета с характерным кислым запахом. На 12-е сутки после экспериментального заражения (43-е сутки п.э.) оба животных этой группы пали. В отличие от них, все иммунизированные поросята 1-й и 2-й опытных групп после экспериментального заражения оставались клинически здоровыми на протяжении всего срока наблюдения. У них продолжался прирост массы тела, при этом статистически достоверных весовых различий между опытными животными не установлено.

Для изучения сроков выделения РВА из организма поросят исследовали ректальные смывы, полученные в динамике, на наличие РНК РВА человека методом ОТ-ПЦР (табл. 1).

Анализ результатов, приведённых в табл. 1, свидетельствует о том, что у поросят 1-й опытной группы после перорального введения клонированного штамма Wa РВА человека наблюдали кратковременное выделение ротавируса, а у животных, иммунизированных HRV внутримышечно, вирусывыделение отсутствовало в течение всего срока наблюдения. После экспериментального заражения у всех животных этих групп РНК в исследуемом материале не выявляли. В отличие от опытных, у поросят контрольной группы

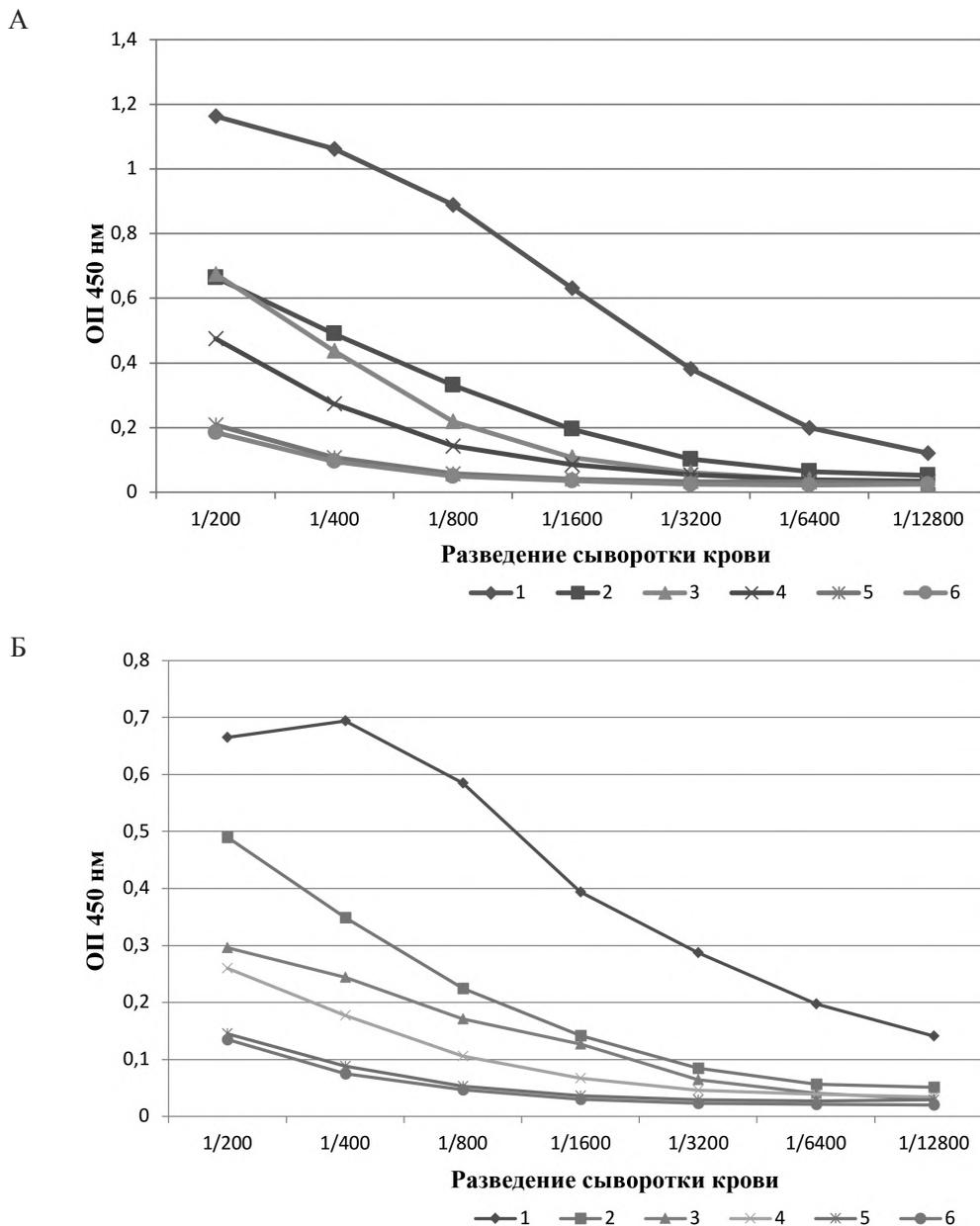


Рис. 2. Кривые титрования проб сыворотки крови свиноматок в непрямом твердофазном ИФА.

А – в качестве антигена использован рекомбинантный белок gVP6, полученный в бакуловирусной системе экспрессии генов; Б – в качестве антигена использован HRV. 1 – гипериммунная сыворотка крови свиный (положительный контроль); 2 – положительная сыворотка крови свиный (слабоположительный контроль); 3 – сыворотка крови от супоросной свиноматки № 3; 4 – сыворотка крови от супоросной свиноматки № 4; 5 – сыворотка крови от супоросной свиноматки № 5; 6 – сыворотка крови неиммунной свиный (отрицательный контроль).

РНК РВА обнаруживали в ректальных смывах, начиная с 1-х суток после заражения и вплоть до гибели. У павших поросят РНК РВА выявили в пробах тонкого отдела кишечника и периферических лимфатических узлах. После проведения патоморфологического исследования отмечали атрофию ворсинок тонкого отдела кишечника. У животных опытных групп подобной картины не наблюдали.

Динамику IgG-антителогенеза у поросят опытных и контрольной групп установили в разработанном

ИФА с использованием рекомбинантного и нативного антигенов, а также в коммерческом ИФА-наборе (табл. 2).

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что достоверно выявляемые РВА-специфические антитела, относящиеся к IgG-изотипу, были зарегистрированы у всех поросят опытных групп только на 43-е сутки п.э. Посмертное обследование павших поросят контрольной группы показало отсутствие антител подобной специфичности в сыворотке крови.

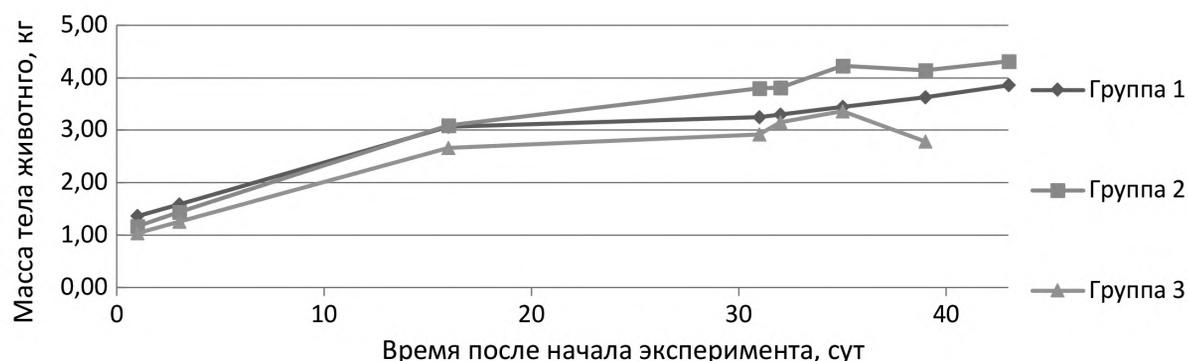


Рис. 3. Динамика изменения массы тела иммунизированных и контрольных поросят в среднем по группе.

Таблица 1
Результаты выявления РНК РВА человека в ректальных смывах поросят методом ОТ-ПЦР

Группа	Время после начала эксперимента, сутки							
	1-е	3-и	16-е	31-е	32-е	35-е	39-е	43-и
1-я (n=3)	-	+	-	-	-	-	-	-
	-	+	-	-	-	-	-	-
	-	+	-	-	-	-	-	-
2-я (n=3)	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
3-я (n=2)	-	-	-	-	+	+	+	Пал
	-	-	-	-	+	+	+	Пал
	-	-	-	-	+	+	+	Пал

Примечание. «+» и «-» – положительная и отрицательная реакция соответственно.

Обсуждение

Многочисленные эксперименты, проведённые в нашей стране и за рубежом, свидетельствуют о том, что к заражению РВА восприимчив не только человек, но и различные виды млекопитающих, включая сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот и свиньи) [27]. Благодаря схожей физиологии новорождённых поросят и младенцев, их способностью аналогичным образом формировать иммунитет слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, а также их восприимчивостью к заражению штаммами РВА человека, новорождённые поросята являются актуальной моделью для изучения патогенеза энтеровирусов и механизмов формирования вирус-специфического иммунного ответа [21, 23].

В предыдущих исследованиях нами были адаптированы к размножению на перевиваемой культуре клеток MARC-145 вирусы клонированного и вирулентного штаммов Wa G1P[8] РВА человека [15]. Для изучения их способности вызывать инфекцию либо предотвращать развитие болезни после иммунизации, т.е. определения иммуногенной активности клонированного штамма Wa РВА, нами был поставлен опыт по двукратной иммунизации 5-суточных

новорождённых поросят породы вьетнамская вислобрюхая аттенуированным вирусом с последующим заражением вирулентным. Кроме живого аттенуированного вируса, для иммунизации был использован концентрированный и очищенный в градиенте плотности сахарозы вирус, являющийся инактивированным цельновирионным препаратом (HRV). Поскольку подобные опыты за рубежом проводили только на поросятах-гнотобиотах, то параллельно мы изучали возможность использования конвенционных новорождённых поросят для этой цели. По результатам эксперимента установлено, что после адаптации к культуре клеток MARC-145 вирулентный вирус сохранил свои иммунобиологические свойства и вызвал у заражённых животных острую форму течения болезни. У инфицированных поросят регистрировали диарею, угнетение, снижение температуры тела, потерю массы тела и очаги поражения в кишечнике, что имитировало клиническую картину РВИ у больных детей, в отличие от экспериментальной модели на грызунах, которые восприимчивы к ротавирусной диарее только до 2-3-недельного возраста [23, 28]. В то же время поросята чувствительны к заражению ротавирусом по меньшей мере до 8-недельного возраста, что достаточно для изучения поствакцинального иммунитета [23, 29].

Экскрецию РВА, установленную с первых суток после заражения и продолжающуюся в течение всего наблюдения, определяли по наличию РНК ротавируса в ректальных смывах с помощью разработанного ОТ-ПЦР. Болезнь закончилась летальным исходом для обоих поросят контрольной группы.

Иммунизация поросят вирусом клонированного штамма Wa РВА защищала их от гибели и от клинических проявлений болезни, причем эффективным оказался не только нативный ротавирус, введенный перорально, но и HRV, не способный к репликации в организме. Это указывает на принципиальную возможность добиться формирования напряжённого иммунитета против РВИ человека, проведя иммунизацию организма смесью вирусных белков. Ранее проведённые исследования в этом направлении показали альтернативный путь разработки новых вакцинных

Таблица 2

Результаты ИФА по выявлению IgG-антител к РВА человека в сыворотке крови поросят

Группа	ИФА/антиген	Время после начала эксперимента, сутки							
		1-е	3-и	16-е	31-е	32-е	35-е	39-е	43-и
1-я	HRV	-	-	-	-	-	-	-	+
	rVP6	-	-	-	-	-	-	+	+
	Ingenasa	-	-	-	-	-	-	-	+
2-я	HRV	-	-	-	-	-	-	-	+
	rVP6	-	-	-	-	-	-	-	+
	Ingenasa	-	-	-	-	-	-	+	+
3-я	HRV	-	-	-	-	-	-	-	-
	rVP6	-	-	-	-	-	-	-	Пали*
	Ingenasa	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Результаты исследований приведены в среднем по группе. Отсекающим значением (cut off) ОП450 для дифференциации положительных и отрицательных результатов реакции являлся показатель 0,3; * – у павших животных посмертно брали кровь, полученную сыворотку исследовали с отрицательным результатом.

препаратов против РВИ – создание нереплицирующихся вакцин, в их составе могут быть рекомбинантные белки или вирусоподобные частицы [6], основным преимуществом которых является улучшенный профиль безопасности вакцин в отношении инвагинации кишечника [30].

Для оценки иммуногенности клонированного штамма Wa РВА и, в перспективе, традиционных и разрабатываемых вакцин нами разработана тест-система на основе непрямого твердофазного ИФА, предназначенная для выявления антител к РВА человека. Для этого были проведены исследования по получению и молекулярно-биологической характеристике рекомбинантного белка VP6, который является групп-специфическим антигеном, способным обнаружить антитела к любым штаммам РВА. Установлено, что по своим антигенным свойствам rVP6 сопоставим с нативным HRV, однако значительно стабильнее при хранении и эффективнее в дискриминации положительных и отрицательных результатов от сомнительных. Использование моноклональных антител вместо поликлональной антисыворотки в качестве конъюгата значительно повышает специфичность и воспроизводимость метода.

IgG является основным изотипом иммуноглобулинов в сыворотке крови всех видов млекопитающих и тот факт, что оба препарата, использовавшиеся для двукратной иммунизации, не стимулировали появление РВА-специфических антител, относящихся к IgG-изотипу, в сыворотке крови до момента экспериментального заражения, можно объяснить тремя основными факторами. Во-первых, различиями в задействованных структурах и механизмах формирования системного и местного иммунитета; во-вторых, различиями в их функционировании у взрослых и новорождённых; в-третьих, тропизмом энтеровирусов, поражающих клетки кишечника. На фоне иммунологической незрелости структур системного иммунитета основным защитным механизмом у новорождённых, в отношении которого и происходит запуск, является местный иммунитет (или иммунитет слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта). Поскольку у свиней, как и у человека, в кишечнике, молозиве, молоке и секрете слизистых оболочек преобладают секреторные антитела, относящиеся к sIgA-изотипу [31], то очевидно, что после иммунизации в первую очередь происходит антигенная стимуляция (помимо Т-лимфоцитов) В-клеток кишечника, большая часть из которых начинает синтезировать антитела подобной специфичности. В отличие от молекул иммуноглобулинов других изотипов, молекулы sIgA устойчивы к протеолитическому расщеплению в желудочно-кишечном тракте и поэтому по сравнению с IgG- или IgM-антителами они наиболее эффективны в связывании с энтеропатогенами. Другая часть В-клеток дифференцируется в клетки памяти, отличительным свойством которых является длительное

присутствие в организме. На этом этапе популяция В-клеток, секретирующая IgG-антитела, достаточно незначительна, однако после заражения быстро происходит так называемый иммунный ответ памяти, в результате которого формируется не только местный (sIgA- и IgG- антитела), но и системный противовирусный иммунитет с доминирующим синтезом IgG-антител. Возможно, в этом случае наличие и уровень IgG-антител к РВА в сыворотке крови будут коррелировать с тяжестью и исходом болезни, однако данное заключение нуждается в подтверждении, для чего необходимы дополнительные эксперименты.

Заключение

Таким образом, резюмируя полученные результаты и имеющиеся данные, можно сделать общее заключение о том, что конвенционных новорождённых поросят породы вьетнамская вислобрюхая можно использовать как для воспроизведения РВИ человека, так и в качестве экспериментальной модели для оценки эффективности различного типа вакцин против РВИ. Два испытуемых нами препарата, изготовленные на основе нативного и очищенного ротавируса клонированного штамма Wa РВА, введённые перорально и внутримышечно с адьювантом соответственно, стимулировали формирование напряжённого иммунитета против РВИ, что выразилось в 100% защите поросят после экспериментального заражения вирулентным эпидемическим штаммом Wa G1P[8] РВА человека. Это свидетельствует о выраженной иммуногенности клонированного штамма Wa РВА и возможности его дальнейшего использования в качестве основного компонента разрабатываемой нами вакцины против РВИ. Вероятно, что появление IgG-антител к РВА в сыворотке крови – маркер формирования системного иммунитета против РВИ, обеспечивающий, наряду с местным, выживание животных после заражения.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 4, 8-14, 16-26, 28-31
см. REFERENCES)**

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Алипер Т.И., ред. *Актуальные инфекционные болезни свиней: Руководство для студентов, научных и практических специалистов*. М.: ЗооВетКнига; 2019.
5. Зайцева Е.В., Ольнева Т.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Шипулин Г.А., Кондрагьева 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: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-7-445-448>
6. Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Ротавирусная инфекция человека. Стратегии вакцинопрофилактики. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 154-9.
7. Денисюк Н.Б. Генетическая характеристика ротавирусов группы А, циркулирующих в Оренбургском регионе в сезон 2016-2017 гг. *Детские инфекции*. 2017; 16(4): 42-5. Doi: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2017-16-4-42-45>
15. Хаметова К.М., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Костина Л.В., Раев С.А., Мусиенко М.И. и др. Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1): 16-22.
27. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. *Вирусы и вирусные вакцины*. М.: Библионика; 2007.

REFERENCES

1. L'vov D.K., ed. *Virology Guide: Human and Animal Viruses and Viral Infections [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
2. Aliper T.I., ed. *Topical Pig Infectious Diseases: A Guide for Students, Scientific, and Practitioners [Aktual'nye infektsionnye bolezni sviney: Rukovodstvo dlya studentov, nauchnykh i prakticheskikh spetsialistov]*. Moscow: ZooVetKniga; 2019. (in Russian)
3. 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): 146-59. Doi: <https://doi.org/10.1086/431499>
4. 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: <https://doi.org/10.1093/molbev/msq137>
5. Zaytseva E.V., Ol'neva T.A., Kuleshov K.V., Podkolzin A.T., Shipulin G.A., Kondrat'eva L.M., et al. Monitoring results of antigenic types of Rotavirus A on the territory of the Russian Federation in the period 2011-2015. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(7): 445-8. Doi: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-7-445-448> (in Russian)
6. Alexseev K.P., Kal'nov S.L., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Human rotavirus infection. Vaccine prevention strategies. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(3): 154-9. (in Russian)
7. Denisyuk N.B. Genetic characteristics of group A rotaviruses circulating in the Orenburg region in the 2016-2017 season. *Detskie infektsii*. 2017; 16(4): 42-5. Doi: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2017-16-4-42-45> (in Russian)
8. 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: <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000505>
9. Gómez M.M., da Silva M.F.M., Volotão E.M., Fialho A.M., Mazzoco C.S., Rocha M.S., et al. G26P[19] rotavirus A strain causing acute gastroenteritis in the American continent. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2018; 113(12): e180344. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760180344>
10. My P.V., Rabaa M.A., Donato C., Cowley D., Phat V.V., Dung T.T., et al. Novel porcine-like human G26P[19] rotavirus identified in hospitalized paediatric diarrhoea patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(12): 2727-33. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.068403-0>
11. PATH (2011-2016). Available at: <https://www.path.org/programs/center-for-vaccine-innovation-and-access/rotaflash/>
12. Burnett E., Jonesteller C.L., Tate J.E., Yen C., Parashar U.D. Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(11): 1666-72. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix186>
13. 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: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
14. Tate J.E., Parashar U.D. Rotavirus vaccines in routine use. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 59(9): 1291-301. Doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciu564>
15. Khametova K.M., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Kostina L.V., Raev S.A., Musienko M.I., et al. Molecular biological properties of the cloned Wa strain of human rotavirus A. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(1): 16-22. (in Russian)
16. 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: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-7-1431>
17. Friess A.E., Sinowatz F., Skolek-Winnisch R., Träutner W. The placenta of the pig. II. The ultrastructure of the areolae. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1981; 163(1): 43-53. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf00315769>
18. Lala P.K., Chatterjee-Hasrouni S., Kearns M., Montgomery B., Colavincenzo V. Immunobiology of the feto-maternal interface. *Immunol. Rev.* 1983; 75: 87-116. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1983.tb01092.x>
19. Butler J.E., Lemke C.D., Weber P., Sinkora M., Lager K.M. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets: XIX. Undiversified B cells with hydrophobic HCDR3s preferentially proliferate in the porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Immunol.* 2007; 178(10): 6320-31. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6320>
20. Saif L.J., Fernandez F.M. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(Suppl. 1): 98-106. Doi: https://doi.org/10.1093/infdis/174.Supplement_1.S98
21. Yuan L., Saif L.J. Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87(3-4): 147-60. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00046-6)
22. Hammerberg C., Schurig G.G., Ochs D.L. Immunodeficiency in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1989; 50(6): 868-74.
23. 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: <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>
24. Babji S., Arumugam R., Sarvanabhavan A., Gentsch J.R., Kang G. Approach to molecular characterization of partially and completely untyped samples in an Indian rotavirus surveillance program. *Vaccine*. 2014; 32(Suppl. 1): A84-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.024>
25. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(6): 1365-73.
26. Close B., Banister K., Baumans V., Bernoth E.M., Bromage N., Bunyan J., et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Lab. Anim.* 1997; 31(1): 1-32. Doi: <https://doi.org/10.1258/002367797780600297>
27. Sergeev V.A., Nepoklonov E.A., Aliper T.I. *Viruses and Viral Vaccines [Virusy i virusnye vaksiny]*. Moscow: Biblionika; 2007. (in Russian)
28. 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.
29. 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: <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1060>
30. Patel M., Shane A.L., Parashar U.D., Jiang B., Gentsch J.R., Glass R.I. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most? *J. Infect. Dis.* 2009; 200(Suppl. 1): 39-48. Doi: <https://doi.org/10.1086/605035>
31. Wagstrom E.A., Yoon K.J., Zimmerman J.J. Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunol.* 2000; 13(3): 383-97. Doi: <https://doi.org/10.1089/08828240050144699>

Поступила 19.08.19

Принята в печать 10.10.19